



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**MOŽNOSTI PRODUKCE PIGMENTŮ KVASINKAMI**

PRODUCTION OF PIGMENTS BY YEASTS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Dominika Gonová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**

**BRNO 2016**



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK1012/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Dominika Gonová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název bakalářské práce:

Možnosti produkce pigmentů kvasinkami

### Zadání bakalářské práce:

- 1) přehledná rešerše týkající se produkce pigmentů různými kvasinkami
- 2) zavedení a optimalizace metod identifikace a kvantifikace vybraných pigmentů
- 3) srovnání produkce karotenoidů kvasinkami rodů *Sporobolomyces* a *Rhodotorula* a pulcheriminu kvasinkou rodu *Metchnikowia*

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Dominika Gonová  
Student(ka)

-----  
Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Karotenoidy sú prirodzene sa vyskytujúce pigmenty syntetizované kvasinkami, baktériami, vláknitými hubami i rastlinami. V posledných rokoch vzrastá záujem o štúdium týchto pigmentov a ich mikrobiologickú produkciu najmä vďaka významným biologickým účinkom pripisovaným práve karotenoidom.

Táto bakalárska práca je koncipovaná ako porovnávacia štúdia šiestich karotenogenných kvasiniek, a to dvoch kmeňov druhu *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces metaroseus* a *Sporobolomyces pararoseus*. Ich kultivácia prebiehala na rôznych živných médiách, kde bol aplikovaný oxidačný stres v podobe peroxidu vodíka a tiež bol použitý odpadný materiál – vaječné cestoviny ako nutričný zdroj.

Všetky študované kmene boli schopné využívať odpadný substrát ako zdroj živín, pričom u rodu *Sporobolomyces* boli na takomto médiu zaznamenané zvýšené produkcie sledovaných metabolitov. Pôsobením oxidačného stresu sa u väčšiny študovaných kvasiniek prejavili nadprodukcie karotenoidov i sprievodných lipidických látok. Kvasinka *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4 sa pri kultivácii na cestovinovom médiu síce vyznačovala najvyššou produkciou karotenoidov (1923,78 µg/g β-karoténu), ale na druhej strane sa u nej prejavil výrazný pokles biomasy. Ako potencionálne najlepší producent biomasy (9,85 g/l) i karotenoidov (780,24 µg/g β-karoténu) sa ukázala kvasinka *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26.

Medzi prírodné pigmenty patrí aj pulcherimín syntetizovaný najmä kvasinkami, ale aj niektorými sporotvornými baktériami. V poslednej dobe sa intenzívne študuje jeho antagonistický efekt, ktorý vykazuje voči viacerým mikroorganizmom, čo sa javí ako veľmi významné z hľadiska biologickej kontroly.

Druhá časť práce je venovaná práve štúdiu regulácie produkcie pulcherimínu a jeho antimikrobiálnej aktivity. Ako kvasinky produkujúce tento pigment boli použité kmene *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia pulcherrima* 149 a *Metschnikowia andauensis* 129, ktoré boli kultivované na rozličných živných médiách obsahujúcich rôzne koncentrácie iónov kovov a tiež peroxid vodíka ako exogénny stres. V rámci štúdia antagonistického efektu pulcherimínu boli ako testované mikroorganizmy využité grampozitívna baktéria *Lactobacillus sakei*, gramnegatívna baktéria *Escherichia coli*, ďalej kvasinka *Candida glabrata* a vláknitá plesň *Phanerochaete chrysosporium*.

Všetky kvasinky rodu *Metschnikowia* boli schopné produkcie pulcherimínu, a teda aj antagonistického efektu, iba v médiách obohatených o železité ióny, pričom intenzita sfarbenia bola priamo úmerná práve koncentrácii železa. Antimikrobiálna aktivita pulcherimínu sa neprejavila iba voči baktérii *Escherichia coli*.

**Kľúčové slová:** karotenoidy, pulcherimín, fyziologický stres, antagonistický efekt, karotenogenné kvasinky, rod *Metschnikowia*

## ABSTRACT

Carotenoids are naturally occurring pigments synthesized by yeast, bacteria, filamentous fungi and plants. In recent years, the interest in the study of these pigments and their microbiological production is increasing mainly due to significant biological effects attributed to carotenoids.

This work is conceived as comparative study of six carotenogenic yeasts: two strains of species *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces metaroseus* a *Sporobolomyces pararoseus*. Their cultivation was carried out in various media where the oxidative stress was applied in the form of hydrogen peroxide and also waste material – egg pasta – was used as a nutrition source.

All studied strains were able to use waste substrate as a source of nutrients, in case of the genus *Sporobolomyces* increasing production of metabolites was observed. Under the oxidative stress, the majority of the studied yeast showed overproduction of carotenoids and accompanying lipid substances. *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4 was characterized by the highest production of carotenoids (1923.78 µg/g β-carotene) at the egg pasta media, but on the other hand, it showed a significant decline in biomass. As potentially the best producer of biomass (9.85 g/l) and carotenoids (780.24 µg/g of β-carotene), the yeast *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 was observed.

Pulcherrimin, synthesized mainly by yeast but also by some spore-forming bacteria, also belongs among natural pigments. Recently, its antagonistic effect that was shown against several microorganisms has been intensively studied, as it seems to be very relevant in regard to biological control.

The second part of the work deals with the regulation of pulcherrimin production and its antimicrobial activity. As the pigment-producing yeast strains were used *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia pulcherrima* 149, *Metschnikowia andauensis* 129, which were cultured on various media containing different concentrations of metal ions and hydrogen peroxide as exogenous stress. In the study of pulcherrimin antagonistic effect, gram-positive bacteria *Lactobacillus sakei*, gram-negative bacteria *Escherichia coli*, yeast *Candida glabrata* and filamentous fungi *Phanerochaete chrysosporium* were used as tested microorganisms.

All studied yeasts were able to produce pulcherrimin, and therefore to show antagonist effect, only in media supplemented with iron, while the color intensity was proportional to the concentration of iron. Antimicrobial activity of pulcherrimin was not observed only against bacteria *Escherichia coli*.

**Keywords:** carotenoids, pulcherrimin, physiological stress, antagonistic effect, carotenogenic yeasts, genus *Metschnikowia*

GONOVÁ, D. *Možnosti produkce pigmentů kvasinkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 67 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

-----  
podpis študenta

### ***Pod'akovanie:***

*Na tomto mieste by som chcela poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce Ing. Andrei Háronikovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, ochotu a všestrannú pomoc pri riešení problémov pri spracovaní tejto práce.*

# OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Kvasinky .....	10
2.1.1	Cytológia.....	10
2.1.2	Rozmnožovanie kvasiniek .....	11
2.2	Výskyt a využitie kvasiniek v priemysle .....	13
2.3	Karotenoidné kvasinky .....	13
2.3.1	Rod <i>Rhodotorula</i> .....	14
2.3.2	Rod <i>Sporobolomyces</i> .....	14
2.4	Kvasinky produkujúce pulcherimín – rod <i>Metschnikowia</i> .....	15
2.4.1	Druh <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	15
2.5	Kultivácia mikroorganizmov na živných médiách.....	16
2.6	Rast mikroorganizmov .....	17
2.6.1	Rastová krivka.....	17
2.7	Vplyv vonkajšieho prostredia na mikroorganizmy .....	18
2.7.1	Vplyv teploty .....	18
2.7.2	Vplyv pH .....	19
2.7.3	Vplyv oxidoredukčného potenciálu .....	19
2.7.4	Vplyv vodnej aktivity .....	19
2.7.5	Vplyv soľného stresu.....	19
2.7.6	Vplyv žiarenia.....	19
2.8	Karotenoidy.....	20
2.8.1	Chemická štruktúra a zaradenie karotenoidov .....	20
2.8.2	Biosyntéza karotenoidov .....	21
2.8.3	Vlastnosti karotenoidov .....	23
2.8.4	Vplyv rôznych faktorov na produkciu karotenoidov .....	23
2.8.5	Priemyselné využitie karotenoidov .....	23
2.9	Pulcherimín .....	24
2.9.1	Chemická štruktúra pulcherimínu .....	24

2.9.2	Syntéza pulcherimínu .....	24
2.9.3	Vlastnosti pulcherimínu.....	25
2.9.4	Vplyv rôznych faktorov na produkciu pulcherimínu .....	25
2.9.5	Možnosť substitúcie železa inými kovmi .....	26
2.10	Metodické postupy.....	26
2.10.1	Absorpčná spektrofotometria.....	26
2.10.2	Extrakcia .....	27
2.10.3	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC.....	27
2.10.4	Ramanova spektroskopia .....	28
3	CIEĽ PRÁCE .....	29
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	30
4.1	Použité chemikálie a materiály .....	30
4.1.1	Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek .....	30
4.1.2	Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov a pre HPLC .....	30
4.2	Prístroje a pomôcky.....	30
4.2.1	Pomôcky pre kultiváciu kvasiniek .....	30
4.2.2	Pomôcky pre izoláciu a analýzu karotenoidov .....	31
4.3	Použité kmene kvasiniek .....	31
4.3.1	Karotenogenné kmene .....	31
4.3.2	Kmene produkujúce pulcherimín .....	31
4.4	Postup práce – produkcia karotenoidov.....	31
4.4.1	Kultivácia vybraných rodov karotenogenných kvasiniek .....	31
4.4.2	Stanovenie množstva biomasy turbimetricky .....	33
4.4.3	Spracovanie biomasy.....	34
4.4.4	Izolácia a extrakcia karotenoidov.....	34
4.4.5	Analýza karotenoidov – HPLC .....	34
4.4.6	Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov .....	34
4.5	Postup práce – produkcia pulcherimínu .....	35
4.5.1	Kultivácia v tekutom médiu.....	35
4.5.2	Kultivácia na tuhom médiu.....	35
4.6	Postup práce – antagonistický efekt kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i> .....	36

4.6.1	Kultivácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i> .....	36
4.6.2	Kultivácia vybraných testovaných mikroorganizmov.....	36
4.6.3	Antagonistický efekt.....	38
5	VÝSLEDKY .....	39
5.1	Morfologické, rastové a produkčné vlastnosti študovaných kvasiniek .....	39
5.1.1	<i>Rhodotorula glutinis</i> (S) .....	39
5.1.2	<i>Rhodotorula glutinis</i> (N).....	41
5.1.3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	44
5.1.4	<i>Sporobolomyces roseus</i> .....	46
5.1.5	<i>Sporobolomyces metaroseus</i> .....	48
5.1.6	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> .....	50
5.2	Pulcherimín .....	53
5.2.1	Vizuálne charakteristiky produkcie pulcherimínu .....	53
5.2.2	Detekcia pulcherimínu pomocou Ramanovej spektroskopie.....	56
5.3	Antagonistický efekt pulcherimínu .....	58
5.3.1	Antagonistický efekt pulcherimínu na kvasinku <i>Candida glabrata</i> .....	59
5.3.2	Antagonistický efekt pulcherimínu na pleseň <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ...	59
5.3.3	Antagonistický efekt pulcherimínu na baktériu <i>Lactobacillus sakei</i> .....	60
5.3.4	Antagonistický efekt pulcherimínu na baktériu <i>Escherichia coli</i> .....	61
6	ZÁVER .....	62
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	65
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	67



# 1 ÚVOD

Pigmenty sú látky prítomné vo všetkých živých hmotách, spôsobujú zmenu farby založenú na selektívnej absorpcii svetla a zohrávajú dôležitú úlohu vo vývoji organizmov. Zo všetkých tried prírodných pigmentov, sú karotenoidy pravdepodobne najrozšírenejšími. Vyskytujú sa u väčšiny rastlín a fototrofných baktérii, kde zohrávajú dôležitú úlohu ako súčasť fotosyntetického aparátu. Nachádzajú sa takisto aj v ovocí a zelenine, ktorým dávajú svoje typické sfarbenie od žltej, oranžovej až po červenú. Karotenoidy môžu byť syntetizované aj rôznymi nefotosyntetizujúcimi mikroorganizmami ako napríklad baktériami, plesňami či kvasinkami. Živočíchy ani ľudia nie sú schopní ich syntézy, a preto ich musia prijímať potravou. V ľudskom organizme plnia významnú funkciu ako antioxidanty, regulátory imunitného systému a sú dôležitým zdrojom provitamínu A. Bol dokázaný ich pozitívny účinok voči množstvu degeneratívnych ochorení, ku ktorým patrí mimo iné i rakovina, taktiež sú dôležité pre správne videnie či zdravú pokožku. Vďaka týmto významným vlastnostiam sa hojne využívajú v rôznych oblastiach priemyslu ako napríklad v potravinárskom, farmaceutickom a poľnohospodárskom.

Medzi ďalšie prírodné pigmenty patrí aj pulcherimín charakteristický svojím hnedým až červenohnedým sfarbením. Je syntetizovaný mikroorganizmami, najčastejšie kvasinkami, ale jeho syntézy sú schopné aj niektoré sporotvorné baktérie. V súčasnej dobe je tomuto pigmentu pripisovaný veľký význam, a to najmä vďaka jeho antimikrobiálnej aktivite voči viacerým mikroorganizmom. Táto vlastnosť vychádza z jeho štruktúry, ktorá mu umožňuje väzbu so železitými iónmi, pričom dochádza k súťaženiu o nutrienty s potenciálnymi patogénmi. Pulcherimín má teda veľký potenciál ako inhibítor mnohých patogénnych mikroorganizmov v rôznych odvetviach priemyslu.

Táto bakalárska práca sa zaoberá reguláciou produkcie biomasy, karotenoidov aj sprievodných lipidických látok u karotenogenných kvasiniek prostredníctvom kultivácie v podmienkach nutričného a oxidačného stresu. V rámci štúdia karotenoidov bolo použitých šesť kvasinkových kmeňov, ktoré boli navzájom porovnávané.

Ďalšia časť tejto práce je zameraná na štúdium možností produkcie pulcherimínu v závislosti na zložení živných médií obsahujúcich rôzne koncentrácie iónov kovov. Aplikovaný bol aj exogénny stres v podobe peroxidu vodíka. Ďalej bol testovaný antagonistický efekt pulcherimínu voči jednotlivým mikroorganizmom, taktiež v závislosti na použitých živných médiách. Ako mikroorganizmy syntetizujúce pulcherimín boli použité štyri kvasinkové kmene rodu *Metschnikowia*.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kvasinky

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy, ktoré sa radia medzi mikroskopické huby (Fungi). Ich slovenské pomenovanie je odvodené od slova *kvasiť*, čo je schopnosť charakteristická pre väčšinu druhov – skvasovať sacharidy na oxid uhličitý a etanol. Tvary buniek kvasiniek bývajú veľmi rozmanité. Úzko súvisia so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania, ale tiež sú ovplyvnené aj vonkajšími podmienkami a starobou bunky. Zvyčajne sú typické pre určité druhy a rody, avšak i v rámci jedného kmeňa dochádza k určitej variabilite. Za základný tvar buniek kvasinkovitých mikroorganizmov je považovaný rotačný elipsoid. Často sa vyskytuje tiež tvar vajcovitý, guľatý, menej často citronovitý, valcovitý a trojuholníkový [1, 2].

#### 2.1.1 Cytológia

Kvasinková bunka pozostáva z pevnej bunkovej steny, jemnej cytoplazmatickej membrány, cytoplazmy obsahujúcej množstvo membránových štruktúr a jadra, ktoré je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou. Pohybové orgány sa u vegetatívnych buniek kvasiniek nevyskytujú [2].

##### 2.1.1.1 Bunková stena

Na povrchu bunky sa nachádza bunková stena s pevnou a silnou štruktúrou, ktorá dáva bunke tvar. Jej hlavnou funkciou je ochrana bunky pred mechanickým poškodením a osmotickým šokom. Bunková stena je tvorená prevažne polysacharidmi (80%), ktoré svojou štruktúrou vytvárajú spleť vlákien vyplnených bielkovinami (6 – 10%). Zastúpenie v stene kvasiniek má aj malé množstvo lipidov, fosfolipidov a fosforečnanov. Bunky kvasiniek majú negatívny náboj spôsobený fosfátovými zvyškami spolu s karboxylovými skupinami bielkovín. Niektoré druhy kvasiniek vytvárajú na povrchu bunkových stien ešte polysacharidové obaly vo forme puzdier [2].

##### 2.1.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána (nazývaná aj plazmalema) je relatívne tenká vrstva tvoriaca osmotické rozhranie medzi obsahom bunky a vonkajším prostredím. Transportné mechanizmy prítomné v membráne zabezpečujú príjem určitých látok bunkou a transport látok z bunky. Je voľne priepustná len pre malé nenabité molekuly. Cytoplazmatická membrána, zložená z lipidov a proteínov, vytvára vychlípeniny vybiehajúce do cytoplazmy [2].

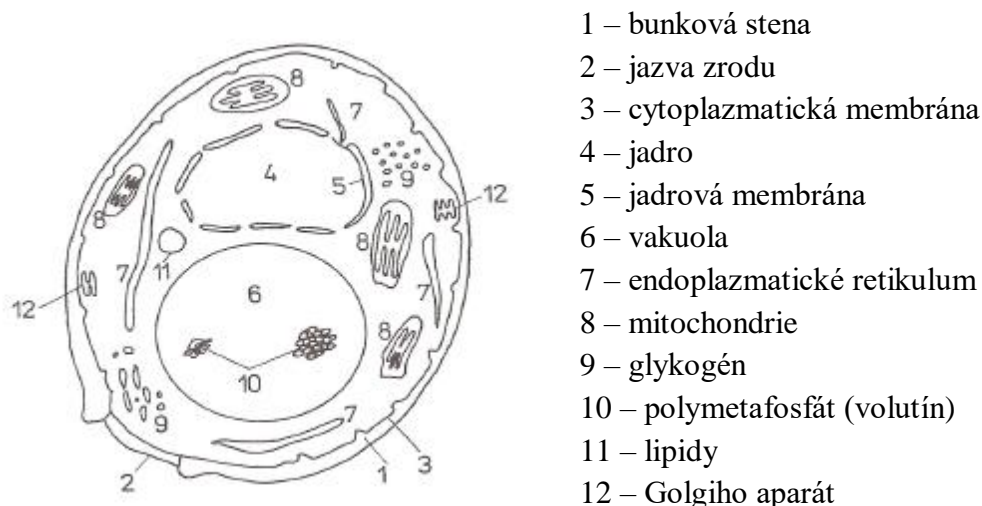
##### 2.1.1.3 Cytoplazma

U mladých buniek kvasiniek sa cytoplazma javí ako homogenná, priehľadná hmota, u starších sa objavujú zrníčka a vakuolizácia. V cytoplazme kvasiniek sa nachádza **endoplazmatické retikulum**, systém dvojitéh membrán, obsahujúce rezervné látky a rôzne enzýmy. Je miestom syntézy peptidov a proteínov. Ďalším membránovým útvarom sú **mitochondrie**

tvorené vonkajšou a vnútornou membránou. Vnútna membrána vytvára vychlípeniny tzv. kryty. Mitochondrie sú sídlom dýchacích enzýmov a systému oxidačnej fosforylácie [2].

Ďalej sú v cytoplazme prítomné **vakuoly** ohraňované jednoduchou membránou. Obsahujú hydrolytické enzýmy, kde dochádza k rozkladu štruktúr buniek s krátkym polčasom rozpadu. Tiež slúžia ako rezervoár pre látky, ktoré sa práve nezúčastňujú metabolizmu. Obsahujú polyfosfáty, draselné ióny, aminokyseliny a puríny. V cytoplazme sa tiež vyskytuje **Golgiho aparát**, ktorý je charakteristický tvarom plochého mechúrka alebo niekoľkých mechúrikov či cisterien uložených vedľa seba. Jeho úlohou je transport prekursorov bunkovej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu [2].

Približne v strede bunky kvasiniek je uložené **jadro** oddelené dvojitou membránou od cytoplazmy. V haploidnom jadre sa nachádza 16 chromozómov, pričom v diploidnom jadre je ich počet dvojnásobný. V jadre je tiež prítomné **jadierko** kosákovitého tvaru, uložené tesne pod jadrovou membránou. Ďalej sa tu nachádza pólóvé teliesko vretienka diskového tvaru, z ktorého vychádzajú vlákna – mikrotubuly. Tie, spolu s telieskom, zohrávajú dôležitú úlohu pri delení jadra počas rozmnožovania buniek [2].



Obrázok 1: Prierez kvasinkovej bunky [2]

## 2.1.2 Rozmnožovanie kvasiniek

Mechanizmus rozmnožovania kvasiniek môže byť dvojaký – rozmnožovanie vegetatívne alebo pohlavné. Vegetatívne rozmnožovanie môže prebiehať pučaním, pučaním na širokej základni alebo delením priehradkami (septácia). Výsledkom pohlavného rozmnožovania je tvorba pohlavných spór [1, 2].

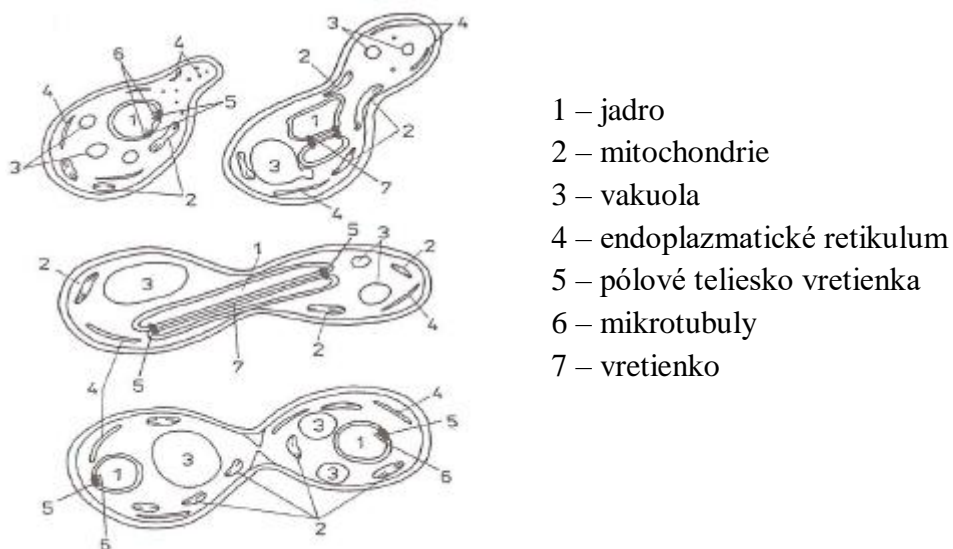
### 2.1.2.1 Vegetatívne rozmnožovanie

Pred samotným **pučaním** dochádza k deleniu endoplazmatického retikula, vakuol a k zmene tvaru mitochondrií na dlhé pretiahnuté. Po počiatku tvorby púčika začne mitotické delenie jadra. Následne jadro spolu s ďalšími zložkami cytoplazmy migruje k púčiku. Počas pučania je vznikajúca dcérska bunka spojená s materskou kanálikom, ktorý sa po migrácii organel do púčika uzavrie cytoplazmatickou membránou. Ďalej v púčiku dochádza k syntéze a rozšíreniu

endoplazmatického retikula. Po vytvorení bunkovej steny, nárastu púčika a spojení vakuol sa dcérska bunka oddelí od materskej a proces pučania je ukončený. Za optimálnych podmienok tento cyklus trvá približne dve hodiny. Niektoré rody alebo kmene kvasiniek po pučaní zostávajú spojené, a tak vytvárajú dlhé zaškrcované vlákna – **pseudomycélium** [2, 3].

U niektorých kvasiniek dochádza k rozmnožovaniu **delením**. Z cytoplazmatickej membrány sa vytvára vychlípenina, tá prerastá smerom do stredu bunky, až dôjde k rozdeleniu cytoplazmy a oddeleniu dvoch jadier. Týmto spôsobom dochádza k vzniku **pravého mycélia**, na ktorom sa v určitých úsekoch nachádzajú zväzky kratších buniek – blastospor (tiež môžu vznikať aj u pseudomycélia). Delenie sa môže uskutočňovať aj bez tvorby mycélia. V takomto prípade vzniká dcérska bunka obdĺžnikového tvaru so zaguľatenými rohmi, ktorá sa vždy oddelí od bunky materskej. Tento typ delenia je charakteristický pre rod *Schizosaccharomyces* [2, 3].

Prechodom medzi pučaním a delením je **pučanie na širokej základni**, pri ktorom je púčik spojený širokým krčkom s materskou bunkou a následne po ukončení uzatvorený priehradkou. Takýto typ rozmnožovania je typický pre rod *Saccharomyces* [2, 3].

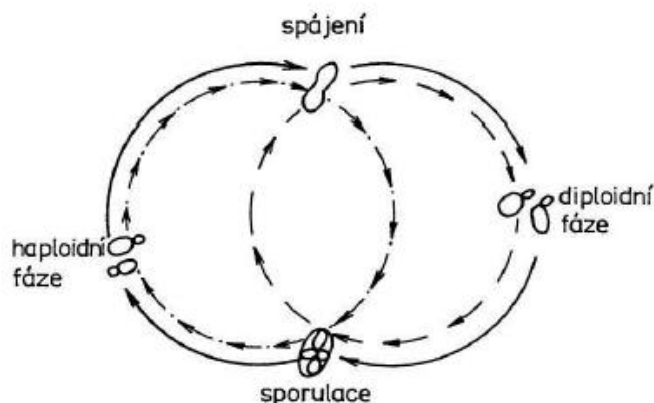


Obrázok 2: Schéma pučania kvasiniek [2]

#### 2.1.2.2 Pohlavné rozmnožovanie

Mnohé kvasinky majú schopnosť sa rozmnožovať pohlavne za vzniku pohlavných spór. Môže dochádzať k tvorbe askospórov – **endospórov** umiestnených vo vrečku alebo asku. Kvasinky, pre ktoré je typický tento typ rozmnožovania, radíme medzi *Ascomycotina*. Výsledkom rozmnožovania niektorých kvasiniek sú pohlavné **exospóry**, čo sú spóry umiestnené na vonkajšej strane spórotvorných buniek. Tieto rody kvasiniek radíme medzi *Basidiomycotina* [1,2,3].

Pri pohlavnom rozmnožovaní vzniká konjugáciou dvoch haploidných buniek (kopuláciou) a spojením ich jadier (karyogamiou) diploidné jadro, ktoré sa následne delí meiózou za vzniku štyroch haploidných jadier. Tie sú potom základom pohlavných spór alebo sa môžu ďalej mitoticky deliť a až potom vznikajú spóry (sporulácia). Haploidná a diploidná fáza buniek kvasiniek sa pravidelne strieda v ich životnom cykle [1, 2, 3].



Obrázok 3: Striedanie haploidnej a diploidnej fáze u kvasiniek [2]

## 2.2 Výskyt a využitie kvasiniek v priemysle

Kvasinky sú v prírode veľmi rozšírené. Najčastejšie sa vyskytujú na materiáloch obsahujúcich cukor, čo je podmienené ich sacharolytickými schopnosťami. Avšak tiež sa nachádzajú v pôde, vzduchu alebo v črevnom trakte ľudí, zvierat a niektorého hmyzu. Ich prenos je najčastejšie realizovaný prostredníctvom hmyzu a vetra. Negatívne sa uplatňujú ako príčiny kontaminácie v droždiarstve, pivovarníctve a vinárstve, kde nepriaznivo ovplyvňujú trvanlivosť a chuť výrobkov. Nepriaznivý vplyv majú aj patogénne kvasinky, ktoré môžu byť príčinou vážnych ochorení, avšak väčšinou len u oslabených jedincov [2].

Hlavné priemyselné využitie kvasiniek spočíva vo výrobe alkoholických nápojov a pekárenského a kŕmneho droždia. Svoje využitie v priemysle majú aj bunky kvasiniek, z ktorých sa izoluje množstvo látok používaných v biochemických laboratóriách, ako sú enzýmy, koenzýmy, nukleozidy a pod. Špeciálne kmene kvasiniek sa využívajú aj na výrobu ergosterolu, teda provitamínu D. Technologicky najvýznamnejší je rod *Saccharomyces*, najmä druh *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý sa uplatňuje ako pivovarnícka, liehovarnícka, vinárska a pekárnska kvasinka. Slúži aj ako modelový mikroorganizmus pre genetické a biochemické práce, a preto ju možno označiť aj za najštudovanejšiu kvasinku. Ďalším významným rodom kvasiniek je rod *Candida*. Tieto kvasinky sú využívané na výrobu kŕmneho droždia z melasy a rôznych odpadových materiálov. Významnú rolu v priemysle tiež zohrávajú kvasinky rodu *Pichia* a *Yarrowia*, ktoré sú používané na produkciu biomasy z n-alkánov ropy pre krmivárske účely a pre biotechnologické čistenie ropy [1, 2].

## 2.3 Karotenoidné kvasinky

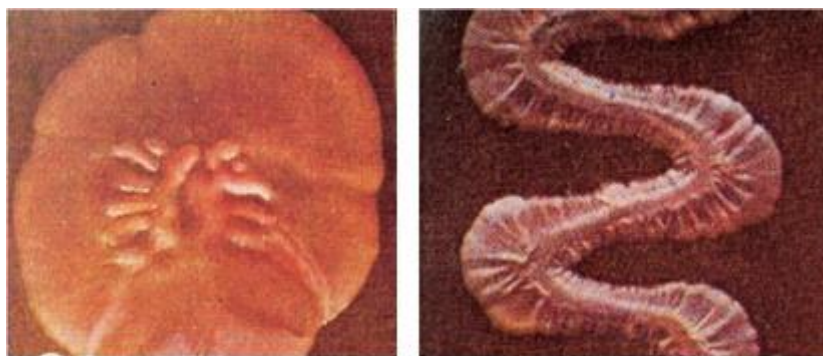
Niektoré kvasinky majú schopnosť tvoriť v bunkách karotenoidné pigmenty. Týmto farbivom zafarbujú svoje kultúry na tehlovočerveno, žlté, oranžovo alebo svetlohnedo. Vďaka tejto typickej čрте sa často označujú aj ako „červené“ kvasinky. Akumulácia tohto pigmentu je hlavným mechanizmom obrany pred oxidačným stresom. Zástupcov takýchto mikroorganizmov možno zaradiť do dvoch systematických skupín, a to do čeľade *Rhodotorulaceae* a *Sporobolomycetaceae* [2, 3, 4].

### 2.3.1 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* sa vyznačuje guľatými až elipsoidnými bunkami, ktoré netvoria spóry a len zriedka tvoria primitívne mycélium. V kvapalnom prostredí tvoria sediment a prstenec svetlej až svetloružovej farby. Náter na agare, ovplyvnený zložením živného média, je hladký, lesklý, slizovitý, riedky aj cestovitý korálovočervenej, pomarančovej alebo lososovej farby [2, 4].

Okrem akumulácie karotenoidov sú všetky druhy rodu *Rhodotorula* tiež charakteristické tvorbou tuku v bunkách. Významný vplyv na túto syntézu má pomer koncentrácie zdrojov uhlíka k dusíku, teda média ochudobnené o dusík podporujú hromadenie lipidov. Veľký význam je prikladaný možnosti získania lipidov s rovnakým obsahom mastných kyselín na výživu živočíchov. Takisto po extrakcii lipidov môže byť biomasa použitá ako zdroj proteínu dôležitého pre výživu [2, 4].

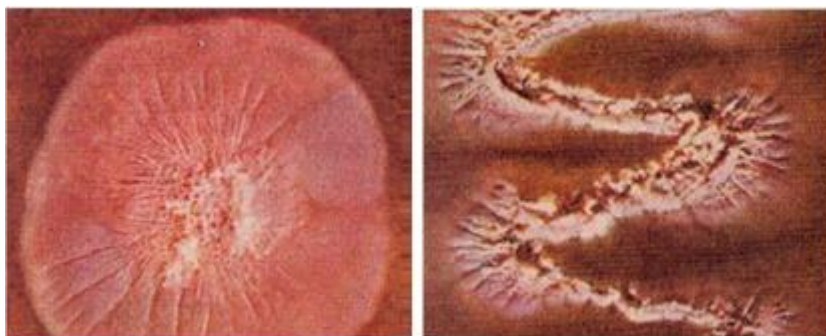
Druhy rodu *Rhodotorula* sú rozšírené po celom svete. Sú prítomné vo vzduchu, v slanej či sladkej vode, v pôdach, na povrchu rastlín, vo vinárskych prevádzkach a tiež aj v telách rôznych živočíchov. Ich náročnosť na životné podmienky je nízka, v pôdach sa často rozmnožujú aj bez zdroja dusíka. Pre tieto aspekty sú často vyhľadávané na rozličné výskumy [2, 4].



Obrázok 4: Kolónia a náter u rodu *Rhodotorula* [24]

### 2.3.2 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* radíme do čeľade *Basidiomycetes*. Je typický tvorbou asymetrických balistokonídií. Bunky týchto kvasiniek sú elipsoidné až pretiahnuté a popri pučiach bunkách tvoria tiež bohaté mycélium. V kvapalnom médiu tvoria ružovú, kučeravú kožu a slabý sediment na rozdiel od kvasiniek rodu *Rhodotorula*. Kolónie na agare sú suché, matné, akoby poprásené, čo je spôsobené balistospórmi. Vyskytuje sa prevažne na listoch stromov alebo na iných rastlinách, odkiaľ sa často dostáva do stojatých i tečúcich vôd. Vyznačuje sa silnou karotenogénou, avšak nemá fermentačné schopnosti [2, 4].



Obrázok 5: Kolónia a náter u rodu *Sporobolomyces* [24]

## 2.4 Kvasinky produkujúce pulcherimín – rod *Metschnikowia*

Rod *Metschnikowia* je charakteristický multilaterálnym pučaním. Bunky sú guľovité, elipsoidné, hruškovité, kosákovité alebo valčekovité. Pseudomycélium je vytvárané len zriedka a to len rudimentárne. Tento rod sa vyznačuje tvorbou askospór, ktoré sú ihlicovitého tvaru a zakončené hrotom na jednom alebo oboch koncoch bez bičíkovitého prívěsku. Aská sú pretiahnuté a ich konce sú ukončené buď guľovitou alebo elipsoidnou pálkou. Z tohto dôvodu ich radíme do čelade *Ascomycetes* [4].

Niektoré druhy parazitujú na bezstavovcoch, iné môžu žiť voľne v prírode. Podľa výskytu ich možno rozdeliť na vodné druhy, napríklad *M. bicuspidata* alebo *M. Zobelli*, a terestrické druhy, kam patria napríklad druhy *M. pulcherrima* a *M. lunata*. Väčšina druhov je v heterotalickom stave, keď sa spóry vytvárajú po konjugácii haploidných opozitných typov [4].

### 2.4.1 Druh *Metschnikowia pulcherrima*

Na tuhých živných pôdach má kolónia cestovitej konzistencie krémovú farbu, ucelený okraj, hladký a lesklý povrch, kde sa môžu tvoriť krátery a záhyby. Tento druh sa často vyskytuje ako dominujúce spoločenstvo mikroorganizmov v kvasiacich muštach vo vinohradníckych oblastiach po celom svete. *Metschnikowia pulcherrima* má veľký potenciál v redukcii patogénnych mikroorganizmov ako biokontrolný agens vďaka pigmentu pulcherimínu, ktorý akumuluje vo svojich bunkách a v médiu [4, 18].



Obrázok 6: Krížový rozter druhu *Metschnikowia pulcherrima*



## 2.5 Kultivácia mikroorganizmov na živných médiách

Kultivácia mikroorganizmov prebieha v laboratóriu spravidla na sterilných živných médiách. Pri voľbe živných médií je nutná znalosť nárokov a podmienok pre rast vybraných mikroorganizmov a zvoliť také zloženie živného média, ktoré čo najviac zodpovedá prirodzeným podmienkam [9].

Základom úspešnej kultivácie je **voda**, ktorá tvorí najdôležitejší komponent živného média. Je nevyhnutná pre rast, vývoj a prežitie mikroorganizmov. Dodržiavať vysoký stupeň akosti použitej vody je nutnosťou. Vo väčšine prípadov heterotrofných mikroorganizmov je potrebná prítomnosť **uhlíka**, väčšinou vo forme jednoduchých sacharidov alebo polysacharidov, ktoré sú zároveň zdrojom kyslíka a vodíka. Pri príprave živného média je potrebné brať na zreteľ vlastnosti príslušného sacharidu, aby sa počas sterilizácie nerozkladal alebo nereagoval s ostatnými zložkami média. Rovnako je potrebná prítomnosť zdroja **dusíka**, čo pri heterotrofných organizmoch býva väčšinou vo forme amónnych solí. Ďalej môžu využívať aj vzdušný dusík, dusitany, dusičnany alebo organicky viazaný dusík v aminokyselinách, peptidoch, peptonoch alebo natívnych bielkovinách [9].

Pre mikroorganizmy, ktoré nie sú schopné produkovať **rastové faktory**, je potrebný ich obsah v živnom médiu. Rastovými faktormi môžu byť aminokyseliny, vitamíny, amíny, purínové a pyrimidínové zásady a vyššie mastné kyseliny. Ďalšími zložkami, ktorých prítomnosť je potrebná v kultivačnom médiu, sú **minerálne látky**, najmä fosfor a horčík. Medzi ďalšie potrebné biogénne prvky patrí draslík, železo, chlór, zinok, vápnik, meď, molybdén, kobalt a nikel. Pri príprave polosyntetických médií sa tiež do nich pridávajú peptóny, rôzne extrakty a hydrolyzáty, ktoré zabezpečujú optimálnu výživu mikroorganizmov [9].

Vzhľadom na vysokú variabilitu požiadaviek rôznych mikroorganizmov na rast existuje široká škála rôznych kultivačných médií, ktoré sa navzájom odlišujú, a preto ich delíme podľa určitých kritérií.

Podľa pôvodu a prípravy:

- prirodzené – mlieko, mrkva, semená, jablko, šťavy, plátky zemiakov atď.,
- synteticko-komplexné – obsahujú chemicky definované zlúčeniny a tiež odvary, maceráty, výluhy alebo hydrolyzáty z prírodných materiálov,
- syntetické – sú chemicky presne definované, zmes anorganických a organických zlúčenín.

Podľa použitia:

- univerzálne – rastú tu veľké skupiny fyziologicky odlišných mikroorganizmov,
- selektívne – podporujú rast určitých skupín mikroorganizmov, rast ostatných inhibujú,
- selektívne-diagnostické – rastie na nich len malá skupina mikroorganizmov, ktorá sa prejavuje charakteristickou reakciou, potláčajú rast nežiaducich mikroorganizmov.

Podľa konzistencie:

- tekuté – neobsahujú žiadne stužovacie látky,
- polotekuté – krémovitá konzistencia spôsobená nízkou koncentráciou stužujúcich látok,



- pevné – vždy obsahujú stužovacie komponenty (agar, želatína alebo gél kyseliny kremičitej) [9].

## 2.6 Rast mikroorganizmov

Rýchlosť množenia kvasinkových organizmov pučaním je pre niektoré kvasné výroby veľmi dôležitá, a to najmä tam, kde je potrebný, čo najväčší výťažok biomasy kvasiniek (napr. droždiarstvo). Rýchlosť rastu sa zvyčajne určuje podľa množstva buniek, ich váhy alebo aj podľa množstva inej prítomnej látky ako napríklad celkového obsahu dusíka, fosforu atď. Často sa využíva aj nepriama metóda, napríklad zvýšením absorpcie svetelného žiarenia, podľa viskozity a pod [1, 3].

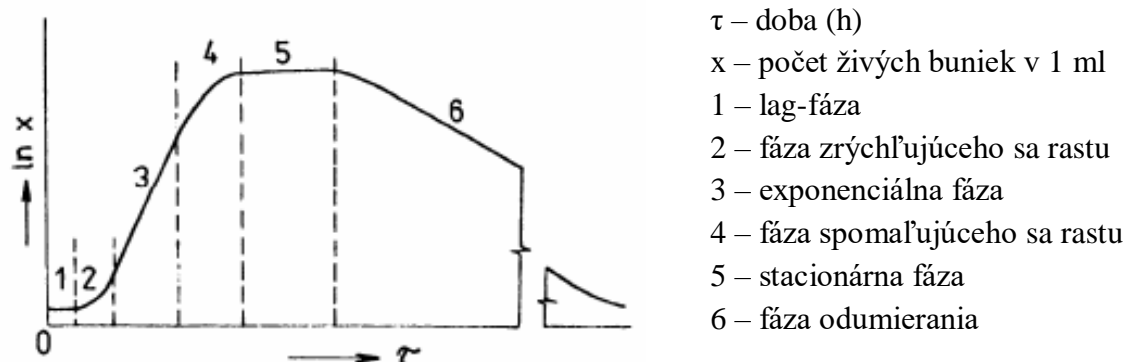
### 2.6.1 Rastová krivka

Priebeh rastu mikroorganizmov je možno znázorniť aj graficky. Krivka zobrazujúca niekoľko fáz rastu organizmu počnúc od zaočkovania až po jeho odumretie, sa nazýva **rastová krivka**. Takáto krivka je charakterizovaná osou  $x$ , na ktorú sa nanáša čas v hodinách a osou  $y$  zobrazujúcu logaritmus počtu buniek [1, 2, 3].

V počiatočnej fáze v tzv. **lag-fáze** sa bunky nerozmnožujú, ale dochádza k zväčšovaniu biomasy a k aktivácii ich enzýmového systému. Bunky sa adaptujú na nové prostredie. Doba tejto fázy závisí od viacerých faktorov, a to hlavne od miery asimilačnej adaptability, od počtu naočkovaných buniek alebo ich veku, od živného média, v ktorom rástli predtým, či od typu aktuálne použitého substrátu [1, 2, 3].

Po lag-fáze nasleduje **fáza zrýchľujúceho sa rastu** a po nej **exponenciálna fáza**. Tá je charakterizovaná najbujnejším rastom. Bunky majú najkratšiu generačnú dobu, ktorá je počas celej fázy konštantná. V dôsledku najvyššej rýchlosti rastu je veľkosť buniek kultúry najmenšia na konci tejto fázy. Bunky vyskytujúce sa v exponenciálnej fáze sú pri prenose do nového média o rovnakom zložení schopné pokračovať v rozmnožovaní s rovnakou generačnou dobou, teda bez alebo s minimálnou lag-fázou [1, 2, 3].

Po tejto fáze postupne dochádza k úbytku živín zo živného média. Následne dochádza k spomaleniu rastu buniek, ktoré je označované ako **fáza spomaleného rastu**. Množstvo novovzniknutých buniek v časovej jednotke klesá. Spomalenie rastu na konci exponenciálnej fázy môže byť spôsobené inhibíciou vzniknutými splodinami metabolizmu alebo vyčerpaním živín. Neskôr nastane až zastavenie prírastu nových buniek. Túto fázu nazývame **stacionárnou**. Kompenzovaním počtu odumierajúcich buniek, často ešte dochádza k pomalému rozmnožovaniu. Doba trvania stacionárnej fázy sa líši u rôznych mikroorganizmov a významne závisí od ich citlivosti k hladovaniu. Ako posledná fáza nasleduje **fáza postupného odumierania buniek**, ktorá môže trvať týždne aj mesiace [1,2,3].



Obrázok 7: Rastová krivka [2]

Fyziologické vlastnosti buniek v rôznych fázach rastu sa navzájom veľmi líšia. Bunky neskorej lag-fázy a rastových fáz vykazujú omnoho vyššiu citlivosť a odolnosť k nepriaznivým podmienkam (zvýšenej teplote, vysokému tlaku a pod.) než bunky nachádzajúce sa v skorej lag-fáze alebo v stacionárnej fáze [1, 2, 3].

## 2.7 Vplyv vonkajšieho prostredia na mikroorganizmy

Vývoj a životná činnosť mikroorganizmov je výrazne závislá na vonkajšom prostredí. K rozmnožovaniu vyžadujú prítomnosť dostatočného množstva zdrojov využiteľnej energie a surovín pre syntézu bunkovej hmoty, a teda optimálne chemické, biologické a fyzikálne podmienky. Avšak mikroorganizmy disponujú schopnosťou sa do istej miery prispôbiť vonkajším podmienkam. Dokážu meniť tvar a zloženie buniek alebo sa prispôbiť zmenou enzymatického vybavenia svojich buniek. Sú schopné meniť aj vonkajšie podmienky, napríklad zmenou pH. Všetky tieto dispozície sú limitované určitými medzami, za ktorými dochádza k zastaveniu rastu až usmrteniu bunky.

Možnosti ovplyvňovania vonkajšieho prostredia a následná obranná aktivita mikroorganizmov voči takémuto druhu stresu má dôležité postavenie aj v rôznych odvetviach priemyslu. Prostredníctvom správneho využívania stresových faktorov je možné dosiahnuť syntézu rôznych látok produkovaných ako obrana mikroorganizmov [1, 2, 3].

### 2.7.1 Vplyv teploty

Jedným z hlavných vonkajších vplyvov je teplota. Ovplyvňuje rýchlosť rozmnožovania a tiež fyziologické funkcie mikroorganizmov. Pre každý druh mikroorganizmu sú významné tri základné hodnoty teploty:

- minimálna teplota – najnižšia teplota, pri ktorej sa rozmnožuje ešte zistiteľnou rýchlosťou,
- optimálna teplota – teplota, pri ktorej sa rozmnožuje najväčšou rýchlosťou,
- maximálna teplota – najvyššia teplota, pri ktorej sa je ešte schopný rozmnožovať.

U kvasiniek sa ako optimálna teplota obyčajne uvádza 25 °C. Pri vyšších teplotách často nastáva prudký pokles rastu spôsobený denaturáciou pre rast nevyhnutných enzýmov. Krátkodobým zvýšením teploty nad maximálnu, je možno docieľiť tzv. teplotný šok, ktorý vedie k rôznym zmenám metabolizmu [1, 2, 3].

### **2.7.2 Vplyv pH**

Rast mikroorganizmov a ich metabolická aktivita je výrazne ovplyvňovaná pH prostredia, tj. koncentráciou vodíkových iónov v prostredí. U kvasiniek sa optimálna hodnota pH pohybuje v kyslom prostredí v rozmedzí hodnôt 4,2 – 5,5. Hodnota pH vplyva na regulačné procesy metabolizmu, čo vedie k zmenám pomeru jeho hlavných produktov [2].

### **2.7.3 Vplyv oxidoredukčného potenciálu**

Oxidoredukčný potenciál je charakterizovaný prítomnosťou oxidačných alebo redukčných činidiel. Oxidačné činidlá (napr. kyslík, peroxidy) spôsobujú pozitívny oxidoredukčný potenciál a redukujúce činidlá (napr. železnaté ióny, vodík) zase negatívny. V dôsledku rozdielnych nárokov mikroorganizmov na kyslík ich primárne delíme na aeróbne a anaeróbne. Aeróbne mikroorganizmy vyžadujú rozpustený kyslík pre správnu funkciu metabolizmu, zatiaľ čo na anaeróbne mikroorganizmy má kyslík negatívny až letálny účinok [2].

### **2.7.4 Vplyv vodnej aktivity**

Nevyhnutnou súčasťou bunkovej hmoty je voda (75 % – 90 %), ktorá je prostredím pre všetky chemické deje v bunke. Potreba vody u mikroorganizmov je charakterizovaná rozmedzím vodných aktivít prostredia, pri ktorých sú ešte schopné rozmnožovania. Vodná aktivita ( $a_w$ ) určitého roztoku je definovaná pomerom tlaku vodných pár nad týmto roztokom k tlaku vodných pár nad destilovanou vodou za rovnakých podmienok

Minimálna  $a_w$  u kvasiniek sa pohybuje v rozmedzí 0,91 – 0,88. Kvasinky schopné rozmnožovania aj pri vodnej aktivite 0,73 radíme medzi osmotolerantné druhy [2].

### **2.7.5 Vplyv solného stresu**

Zvýšená salinita prostredia spôsobuje vznik dvoch stresových faktorov, ktorými sú jednak toxické látky inhibujúce veľké množstvo bunkových funkcií a jednak osmotické komponenty zvyšujúce turgor bunky, ktoré sú vyvolané rastom intercelulárnej koncentrácie  $\text{Na}^+$ . Vplyvom solného stresu zvyčajne dochádza k hromadeniu osmoticky aktívnych látok, ktorých funkciou je vyrovnanie rastúceho externého osmotického tlaku a tiež premena membránového transportného systému, tak, aby došlo k vylúčeniu  $\text{Na}^+$  z bunky do prostredia [2].

### **2.7.6 Vplyv žiarenia**

Elektromagnetické vlnenie o rôznych vlnových dĺžkach sa výrazne odlišuje svojím fyziologickým účinkom na mikroorganizmy. Infračervené žiarenie a Hertzove vlny, teda vlnenie o najdlhších vlnových dĺžkach, pôsobia na mikroorganizmy tepelnými účinkami. Viditeľné svetlo sa využíva predovšetkým ako zdroj energie pre fototrofné mikroorganizmy.

V kontraste je ultrafialové a Röntgenovo žiarenie, ktoré má na mikroorganizmy silné mutagénne až smrtiace účinky [2].

## 2.8 Karotenoidy

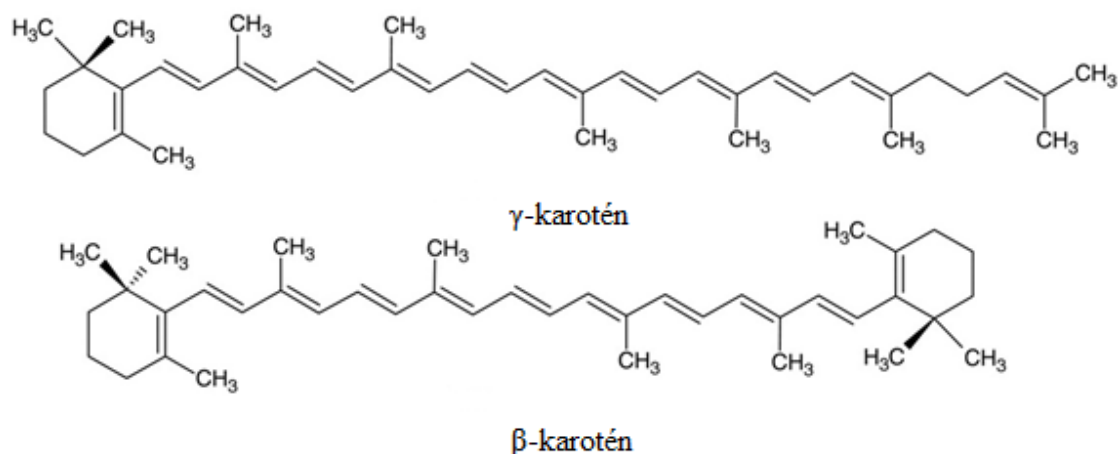
Karotenoidy sú prírodné lipofilné pigmenty, typické žltým až červeným sfarbením. Univerzálne sa vyskytujú vo fotosyntetických systémoch vyšších rastlín a fototrofných baktérii, kde zohrávajú dôležitú rolu pri prenose energie ako doplnkové fotoaktívne pigmenty. Na druhej strane, ich prítomnosť je nevyhnutná v nefotosyntetizujúcich organizmoch ako ochrana pred fotooxidatívnym poškodením. Navyše, u cicavcov sú dôležité ako prekursor vitamínu A [5, 6, 7].

### 2.8.1 Chemická štruktúra a zaradenie karotenoidov

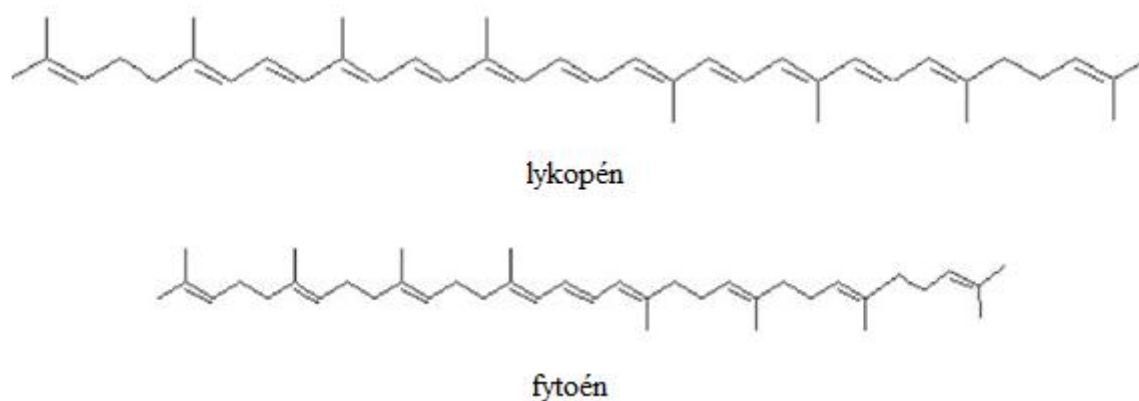
Karotenoidy sa radia do skupiny tetraterpenoidov. Kostra molekuly karotenoidov je zvyčajne tvorená polyenovým reťazcom obsahujúcim 40 uhlíkových atómov usporiadaných do päťuhlíkatých izoprenových jednotiek. Karotenoidy, ktoré vo svojej štruktúre majú len uhlík a vodík, sú známe ako **karotény** a sú typické červeným sfarbením. Medzi najznámejších zástupcov patrí karotén, lykopén a fytoén. Do druhej skupiny sa radia uhľovodíky, ktoré obsahujú vo svojej štruktúre aj kyslík, a tieto kyslíkaté deriváty karoténov sa nazývajú **xantofyly**. Sú charakteristické žltým sfarbením a patria sem významní reprezentanti ako astaxantín, kantaxantín a luteín. Farebnosť je dosiahnutá vďaka konjugovaným dvojitém väzbám vyskytujúcim sa v reťazci. Väčšinou sa tieto dvojité väzby vyskytujú v konfigurácii *trans*. Reťazce karotenoidov môžu byť alifatické alebo sú zakončené deväťčlennou jednotkou, ktorá môže byť usporiadaná acyklicky alebo cyklicky na jednom či oboch koncoch. Podľa tohto zakončenia ich možno rozdeliť do troch skupín:

- Monocyklické (torulén, torularodín,  $\gamma$ -karotén)
- Dicyklické ( $\beta$ -karotén)
- Acyklické (lykopén, neurosporén, fytoén, fytofluén,  $\delta$ -karotén)

Všeobecne platí, že karotenoidy sú denominované na základe rôznych variant štruktúry bočných reťazcov, hlavne podľa polohy dvojitej väzby. Základná kostra karotenoidov môže byť modifikovaná rôznymi spôsobmi ako je napríklad hydrogenácia, dehydrogenácia, cyklizácia, izomerácia, preskupenie, migrácia dvojitej väzby, skrátenie alebo predĺženie reťazcov a pod., čo má za následok veľkú rozmanitosť štruktúr [5, 6, 7].



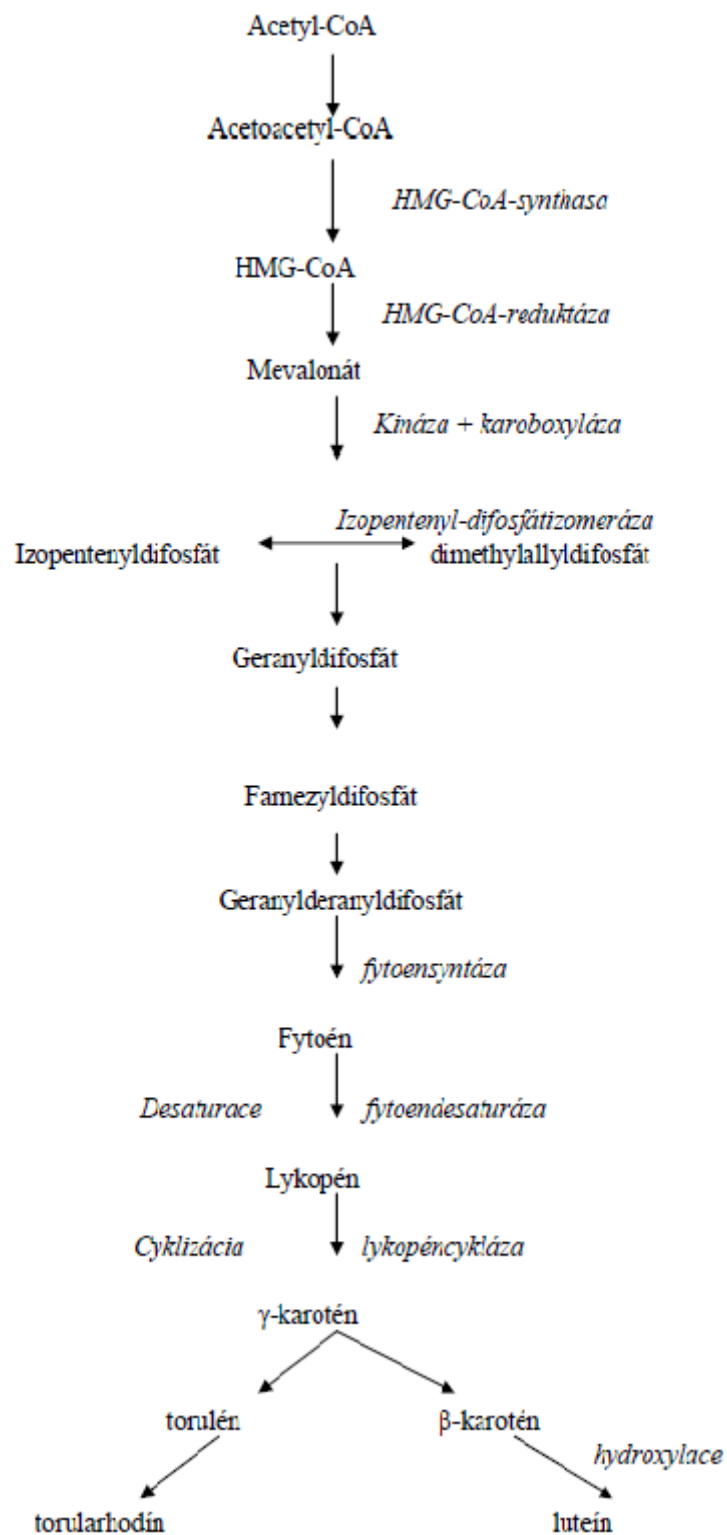
Obrázok 8: Štruktúra niektorých cyklických karotenoidov [6]



Obrázok 9: Štruktúra niektorých acyklických karotenoidov [20]

### 2.8.2 Biosyntéza karotenoidov

Syntéza začína konverziou acetyl CoA na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) za katalýzy HMG-CoA syntázy. Potom je HMG-CoA premenený na mevalonovú kyselinu (MVA), ktorá je prvým prekursorom biosynthetickej dráhy. MVA je postupne fosforylovaná a dekarboxylovaná za vzniku izopentenylidifosfátu (IPDP). Následnou izomeráciou IPDP vzniká dimetylallyldifosfát (DMADP). Vzniknuté meziprodukty IPDP a DMADP podliehajú kondenzácii za vzniku geranyldifosfátu (GDP – prekursor monoterpénov). Potom dochádza ku kondenzácii dvoch jednotiek GDP za tvorby fytoénu, ktorý je prvým  $C_{40}$  karoténom syntézy. V ďalších krokoch dochádza už k syntéze cyklických a acyklických karoténov a xantofylov za účasti rôznych špecifických reakcií [5, 6, 7].



Obrázok 10: Schéma biosyntézy karotenoidov [21]

### 2.8.3 Vlastnosti karotenoidov

Karotenoidy sú odolné voči pôsobeniu redukčných činidiel, k zmene pH a sú nerozpustné vo vode. Kvôli výskytu dvojitych väzieb sú veľmi citlivé k svetlu a oxidácii. Polyenový reťazec je zodpovedný za chemickú reaktivitu voči oxidačným činidlám a voľným radikálom, a preto sa správajú ako antioxidanty. Vo všeobecnosti platí, že čím dlhší polyenový reťazec je, tým väčšia je aj stabilizačná schopnosť peroxylového radikálu. Karotenoidy, vďaka systému dvojitych väzieb, sú schopné absorbovať svetlo vo viditeľnej oblasti svetelného spektra. Absorpčné maximum sa pohybuje v rozmedzí vlnových dĺžok 400 – 500 nm [5, 6, 7, 20].

### 2.8.4 Vplyv rôznych faktorov na produkciu karotenoidov

**Zdroj uhlíka** je dôležitým faktorom, na ktorom závisí spôsob metabolizovania kvasiniek. Glukóza alebo iné skvasiteľné cukry sú metabolizované glykolýzou, následne dochádza k alkoholovému kvaseniu, dokonca aj v prítomnosti kyslíka. Naopak, nefermentované cukry ako napríklad etanol alebo sukcinát sú produkované prostredníctvom oxidácie acetyl – CoA pred vstupom do citrátového cyklu. Z tohto dôvodu mnohí autori uvádzajú, že etanol podporuje tvorbu karotenoidov [10].

Dôležitou úlohou mikroorganizmov je ich ochrana pred škodlivými účinkami **svetla**, kedy ako obranný mechanizmus využívajú karotenogézu. Syntéza karotenoidov je teda pozitívne ovplyvnená bielym svetlom, ktoré tiež zvyšuje enzymatickú aktivitu mikroorganizmov [7, 10].

Ako bolo už vyššie spomenuté, **teplota** významne ovplyvňuje rast buniek a tiež produkciu rôznych metabolitov, vrátane karotenoidov. Navyše sa podieľa na regulácii koncentrácie enzýmov, ktoré sa zúčastňujú na syntéze týchto pigmentov. Jej vplyv závisí na druhu mikroorganizmu a na množstve produktu. Teplota, pri ktorej je produkcia karotenoidov najvyššia, bola stanovená na 29 – 30 °C u kvasinky *Rhodotorula glutinis* [7, 10].

Vzhľadom k tomu, že karotenogéza je aeróbny proces, hladina **kyslíka** v kvasinkovej kultúre je nenahraditeľným faktorom vplyvujúcim na akumuláciu karotenoidov. S ohľadom na možnosť oxidácie karoténov na xantofyly je možné zmenou hladiny kyslíka regulovať aj ich produkciu v prospech jednej či druhej skupiny karotenoidov [7, 10].

Za faktory ovplyvňujúce produkciu červených pigmentov sú tiež považované aj rôzne **ióny kovov a solí**. Stopové prvky majú schopnosť selektívne ovplyvňovať karotenogézu. Napríklad, v prípade  $Zn^{2+}$  a  $Al^{3+}$  sa jedná o stimulačný efekt na  $\beta$ -karotén a  $\gamma$ -karotén, zatiaľ čo  $Mn^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  pôsobia inhibične na tvorbu torulínu. Táto selektivita je spôsobená reguláciou špecifických enzýmov podieľajúcich sa na karotenogéze [7, 10].

### 2.8.5 Priemyselné využitie karotenoidov

Karotenoidy v priemysle majú uplatnenie najmä ako výživové doplnky, potravinárske farbivá, prídavky do krmív a tiež slúžia na farmaceutické účely. Dôležitú rolu zohrávajú aj v ľudskom zdraví ako prevencia degeneratívnych ochorení. Z tohto dôvodu je o biotechnologickú výrobu karotenoidov rastúci záujem. V posledných rokoch je veľká pozornosť venovaná najmä prírodným metódam výroby, pretože takto dosiahnutý výťažok

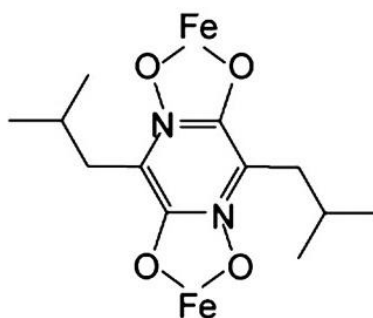
nemôže konkurovať chemickej syntéze. V tomto ohľade majú veľký význam práve mikroorganizmy schopné konverzie rôznych substrátov na karotenoidné pigmenty. S cieľom zvýšenia výťažnosti karotenoidov a zároveň zníženia nákladov na biotechnologický proces, mnohé štúdie sú zamerané na optimalizáciu podmienok kultivácie, najmä na nutričné a fyzikálne faktory. Kultivácia červených kvasiniek je tiež často prevádzaná na rôznych odpadných substrátoch ako napríklad obilniny, srvátka, melasa alebo surový glycerol, v snahe čo najviac znížiť náklady a súčasne zachovať vysokú produkciu karotenoidov. Rovnako aj rôzne druhy stresu majú značný význam na produkciu karotenoidov. Aplikáciou stresových faktorov je možno realizovať zvýšenú produkciu vybraných metabolitov a tiež môže viesť k rozmanitosti štruktúr karotenoidov, ktoré v prípade obvyklých chemických metód nie je možné dosiahnuť [26, 27].

## 2.9 Pulcherimín

Pulcherimín je červený až hnedý pigment syntetizovaný niektorými kvasinkami a tiež niektorými kmeňmi kvasiniek rodu *Metschnikowia* kultivovaných na médiách s obsahom železa. Schopnosť syntézy tohto pigmentu bola pozorovaná tiež u niektorých aeróbných sporotvorných baktérii napríklad u druhu *Micrococcus violagabriellae*.

### 2.9.1 Chemická štruktúra pulcherimínu

Pulcherimín je železitá soľ dvojsýtnej kyseliny nazývanej kyselina pulcherimínová (3,6-dihydroxy-2,5-diisobutylpyrazín-1,4-dioxid). Štruktúra pulcherimínu sa môže mierne meniť v závislosti na vybranom kmeni alebo ako odozva na použité kultivačné podmienky. Z toho vyplýva, že termín „pulcherimín“ označuje pigmenty pozostávajúce zo železitých chelátov substituovaných pyridinovými prstencami s izobutyllovými skupinami viazanými v polohách 2 a 5, pričom sa tieto pigmenty navzájom mierne odlišujú inými štrukturálnymi detailmi [11, 12, 13, 14, 15].

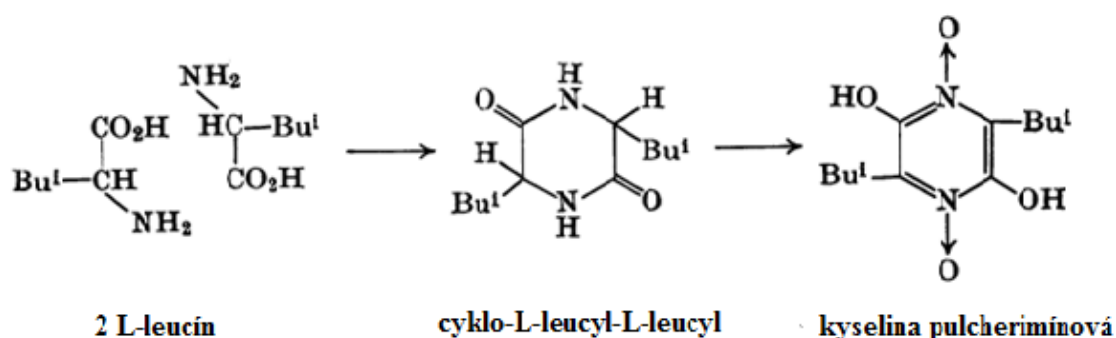


Obrázok 11: Štruktúra pulcherimínu [17]

### 2.9.2 Syntéza pulcherimínu

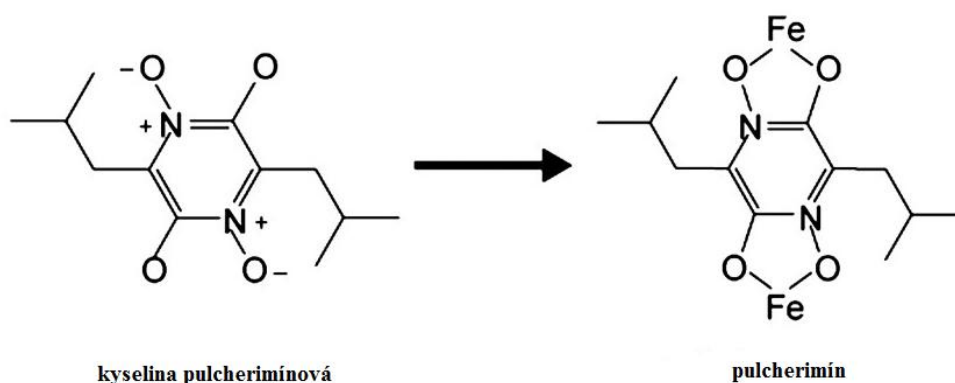
Kyselina pulcherimínová je syntetizovaná z L-leucínu a medziproduktom tejto biosyntézy je cyklo-L-leucyl-L-leucyl [12].





Obrázok 12: Biosyntéza kyseliny pulcherimínovej [12]

Následne je z kyseliny pulcherimínovej syntetizovaný pulcherimín prostredníctvom neenzymatickej reakcie medzi kyselinou pulcherimínovou a železitými iónmi v prostredí [12].



Obrázok 13: Schéma syntézy pulcherimínu z kyseliny pulcherimínovej [17]

### 2.9.3 Vlastnosti pulcherimínu

Pulcherimín je veľmi málo rozpustný vo vode, pravdepodobne len v koloidnej fáze a nerozpustný vo všetkých organických rozpúšťadlách. Naopak, je ľahko rozpustný v silných alkalických rozpúšťadlách. Je nezvyčajne odolný voči relatívne silným kyselinám. K rozkladu pulcherimínu dochádza približne pri 150 °C [11, 13, 23].

Veľký význam pulcherimínu je pripisovaný aj jeho už vyššie spomenutému antagonistickému účinku proti vláknitým hubám, kvasinkám a baktériám. Vzhľadom na to, že železo je často nevyhnutné pre rast iných mikroorganizmov, inhibičný účinok je pravdepodobne spôsobený tým, že syntézou pulcherimínu dochádza k vyčerpaniu všetkého voľného železa prítomného v médiu. Takto vlastne dochádza ku konkurencii o spoločný zdroj živín. Intenzita pigmentácie je priamo úmerná antimikrobiálnej aktivite [18, 19].

### 2.9.4 Vplyv rôznych faktorov na produkciu pulcherimínu

Produkcia pulcherimínu je priamo spätá s prítomnosťou voľného **železa** v kultivačnom prostredí. Miera koncentrácie železa určuje či je pigment tvorený intracelulárne alebo extracelulárne. V prítomnosti 0,005% železa v médiu sa pigmentácia vyskytuje tak ako v biomase tak aj v médiu. Táto hodnota koncentrácie železa bola definovaná ako hraničná. V prípade koncentrácie nižšej ako je hraničná hodnota dochádza k tvorbe pigmentu v médiu.

V opačnom prípade, keď je koncentrácia vyššia ako definovaná hraničná hodnota železa, pigmentácia sa vyskytuje v biomase, pričom farebné zóny pulcherimínu v médiu úplne absentujú. Miera intenzity sfarbenia biomasy alebo média je priamo úmerná koncentrácii železa [16, 23].

Takisto bolo potvrdené, že aj prítomnosť **kyslíka** je nevyhnutná k syntéze pulcherimínu, a teda v anaeróbnom prostredí nedochádza k sekrécii tohto pigmentu. Inými slovami možno zhrnúť, že oboje, železo aj kyslík, sú významnými a nepostrádateľnými regulátormi a faktormi, ktoré vedú k produkcii pulcherimínu [16, 23].

V rámci výskumu faktorov ovplyvňujúcich tvorbu pulcherimínu bola tiež pozornosť upriamená na vplyv pH a tiež na vplyv rôznych zdrojov uhlíka, najmä na rozdiel pri použití skvasiteľných a neskvasiteľných cukrov. Experimentálnymi štúdiami bolo preukázané, že voľba zdroja uhlíka nemá vplyv na produkciu pigmentu a teda oba zdroje, skvasiteľné aj neskvasiteľné cukry, sú rovnako vhodné pre produkciu pulcherimínu. Takisto vplyv pH na produkciu pulcherimínu nebol pozorovaný [23].

### 2.9.5 Možnosť substitúcie železa inými kovmi

S predpokladom na chelatačnú aktivitu kvasiniek by sa dalo očakávať, že chelatácia by nemala byť obmedzená len na železité ióny, ale mala by sa prejavovať aj v prítomnosti iných iónov kovov, čo by mohlo viesť k tvorbe pigmentov podobných pulcherimínu. Táto teória bola podporená aj experimentálnym testom, kde bola pozornosť venovaná medi, kobaltu, titánu a niklu ako kovom schopným tvorby stabilných organických komplexov. Bolo dokázané, že aj iné kovové ióny indukujú bunky k produkcii pigmentov vyznačujúcimi sa chelatickými vlastnosťami. Všetky tieto pigmenty sú charakteristické sfarbením zhodným so sfarbením kovu zodpovedným za vznik týchto chelátov. Avšak vo všetkých prípadoch, prídavok železitých iónov do pigmentov spôsobil konverziu pigmentov na pulcherimín. Z toho vyplýva, že všetky testované kovy sa menej silno viažu k ligandu než železo [23].

## 2.10 Metodické postupy

### 2.10.1 Absorpčná spektrofotometria

Stanovenie látok molekulovou absorpčnou spektrofotometriou je založené na meraní absorpcie elektromagnetického žiarenia molekulami zriedených roztokov v ultrafialovej a viditeľnej oblasti v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm. Absorpcia je sprevádzaná excitáciou valenčných elektrónov [8].

V spektrofometroch sa zvyčajne ako zdroj primárneho žiarenia používa najmä deutériová, prípadne vodíková výbojka pre ultrafialovú oblasť a halogénová alebo wolfrámová žiarovka pre viditeľnú oblasť. Materiál kyvety, v ktorých sú vzorky merané, nesmie absorbovať žiarenie v sledovanom vlnovom rozsahu. Veľkosť absorpcie je detekovaná pomocou fotoelektrických detektorov. Kvantitatívne stanovenie je založené na platnosti Lambert-Beerovho zákona, z ktorého vyplýva, že absorbancia je priamo úmerná koncentrácii absorbujúcej látky  $c$ , hrúbke kyvety  $l$ , ale tiež závisí na molárnom absorpčnom koeficiente  $\varepsilon$ :

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon_{\lambda},$$

kde  $c$  je látková koncentrácia ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ),  $l$  je hrúbka absorbujúcej vrstvy (cm) a  $\varepsilon_\lambda$  je molárny absorpčný koeficient, tj. konštanta pre danú látku za daných podmienok pri určitej vlnovej dĺžke ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [8].

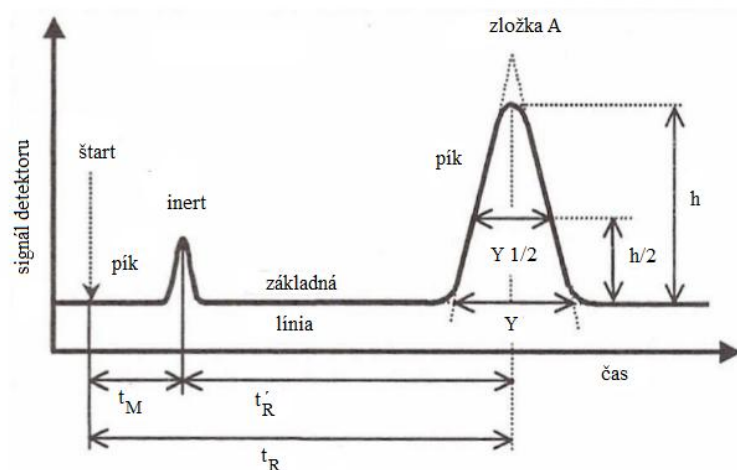
### 2.10.2 Extrakcia

Extrakcia je najvyužívanejšou metódou pre izoláciu karotenoidov. V prípade uvoľňovania karotenoidov zo vzoriek, ktoré obsahujú veľké množstvo vody, sa ako extrahovadlo využíva acetón. Karotenoidy sa u kvasiniek nachádzajú najmä v lipoproteínovej frakcii membrán, a z tohto dôvodu je potrebné vzorku zmydelňovať s prídavkom alkoholického roztoku NaOH alebo KOH, aby došlo k izolácii pigmentov. Po zmydelnení nasleduje niekoľkonásobná extrakcia nepochlannými organickými rozpúšťadlami, napríklad dietyléterom [5, 20, 22].

### 2.10.3 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Chromatografia patrí medzi separačné metódy, z čoho je zrejmé, že jej podstatou je oddelenie jednotlivých zložiek obsiahnutých vo vzorke. Pri tejto metóde sa vzorka vnáša medzi dve navzájom nemiesiteľné fázy. Mobilná fáza, ktorou je pri kvapalinovej chromatografii kvapalina, je pohyblivá a stacionárna fáza je nepohyblivá. Vzorka je nanášaná na začiatok stacionárnej fázy a je medzi jej časticami unášaná pohybom mobilnej fázy. Jednotlivé zložky vzorky môžu byť stacionárnou fázou zachycované a zdržované. Takto dochádza k postupnej separácii jednotlivých častí vzorky a to tak, že ako prvé sa na koniec dostávajú zložky najmenej viazané, a naopak ako posledné sa na koniec stacionárnej fázy dostávajú tie zložky, ktoré sú ňou viazané najsilnejšie. V HPLC má tiež výrazný vplyv na separáciu aj voľba mobilnej fázy, nakoľko závisí na afinite analytu ku každej z nich, na rozdiel od plynovej chromatografie [8].

Základom vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie – HPLC je klasické kolonové prevedenie. K efektívnej separácii je potreba dostatočného množstva malých zrníček sorbentu, ktoré spôsobujú kvapaline pri prechode značný odpor. Z tohto dôvodu je nutné pracovať pri vysokom tlaku. Vzorky sú dávkované prostredníctvom injekčných striekačiek do viacerých dávkovacích kohútov. Delenie sa odohráva v krátkych náplňových nerezových kolónach o dĺžke 15 – 30 cm. Ako analyzátory separovaných zložiek sa najčastejšie využívajú fotometrické detektory, ktoré stanovujú absorbanciu eluátu vychádzajúceho z kolóny [8, 20, 22].



Obrázok 14: Popis chromatogramu [8]

Grafickým znázornením separácie prostredníctvom HPLC je chromatogram popisujúci závislosť signálu detektoru na čase. Záznam z chromatogramu znázorňuje jednotlivé zložky vzorky rozdelené medzi stacionárnu a mobilnú fázu pomocou tzv. pík, ktoré sú charakterizované svojou polohou a plochou. Molekula zložky stráví v kolóne určitú dobu na základe jej afinity k fázam a táto doba sa nazýva retenčný čas  $t_R$ . Retenčný čas je definovaný súčtom časov, ktoré molekula stráví v mobilnej fáze – mŕtvy retenčný čas  $t_M$  a v stacionárnej fáze – redukovaný retenčný čas  $t'_R$ . Vďaka retenčným časom charakteristickým pre konkrétne zložky je možné previesť kvalitatívnu analýzu stanovovanej vzorky. Plocha piky zase súvisí s kvantitatívnym zastúpením zložky [8].

#### 2.10.4 Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia je metódou vibračnej spektroskopie, vhodná k identifikácii látok pri určovaní ich štruktúry a zloženia. Samotné meranie je pomerne rýchle, nedeštruktívne a nevyžaduje žiadnu špeciálnu úpravu vzoriek. Využíva sa pri analýze pevných, kvapalných a plyných látok, ďalej tiež pri analýze povrchov či biologických systémov, a teda táto metóda je tiež používaná pre rýchlu identifikáciu sledovaných metabolitov u kvasiniek. Praktické uplatnenie nachádza v rôznych odvetviach priemyslu ako napríklad v geochemii, farmaceutickom priemysle, biológii či v lekárstve. Tiež je využívaná na sledovanie rôznych komponentov buniek, tkanív alebo mikroorganizmov [25].

Princíp Ramanovej spektroskopie je založený na nepružných zrážkach fotónov s vibrujúcimi molekulami, pri ktorých dochádza k prechodu molekuly do excitovaného stavu. Molekula, pôvodne nachádzajúca sa v základnom elektrónovom a vibračnom stave, sa môže vrátiť do niektorého z vyšších vibračných stavov prostredníctvom vyžiarovania energie získanej zrážkou. Potom sledované emitované žiarenie má menšie vlnočty ako absorbované žiarenie, a tak môžeme sledovať Stokesové čiary Ramanovho spektra. Pre túto metódu sa zvyčajne používajú disperzné spektrometre ale aj spektrometre s Fourierovou transformáciou. V spektrometroch sa obvykle ako zdroj žiarenia využívajú rôzne typy laserov [25].

### 3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom predloženej bakalárskej práce zameranej na možnosti produkcie pigmentov vybranými kmeňmi kvasiniek je riešenie nasledujúcich čiastkových úloh:

- prehľadná rešerš týkajúca sa produkcie pigmentov rôznymi kvasinkami
- prevedenie a optimalizácia metód identifikácie a kvantifikácie vybraných pigmentov
- porovnanie produkcie karotenoidov kvasinkami rodu *Sporobolomyces* a *Rhodotorula* a pulcheriminu kvasinkou rodu *Metschnikowia*

## **4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 Použité chemikálie a materiály**

#### **4.1.1 Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek**

Bakteriologický agar, Himedia (India)  
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)  
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lachema (ČR)  
Chlorid železitý, Katedra analytické Farmaceutické fakulty UK (SR)  
D-glukóza monohydrát p.a., Penta (ČR)  
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)  
Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)  
Hovädzí autolyzát, Himedia (India)  
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)  
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)  
Síran horečnatý p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)  
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)  
Síran meďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)  
Octan sodný trihydrát p.a., Lachema (ČR)  
Pepton aus Casein, Roth (Nemecko)  
Peroxid vodíka 3% COO, Coopharma s.r.o. (ČR)  
Trypton, Sigma – Aldrich (SRN)  
Vaječné cestoviny Avelopa, s.r.o. (ČR)

#### **4.1.2 Chemikálie použité na izoláciu karotenoidov a pre HPLC**

Acetón p.a., Lachema (ČR)  
Diethyléter p.a., Lachema (ČR)  
Etanol pre UV-VIS, Lachema (ČR)  
Etanol pre HPLC, Sigma – Aldrich (SRN)  
Hydroxid draselný p.a., Lachema (ČR)  
Metanol pre HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

### **4.2 Prístroje a pomôcky**

#### **4.2.1 Pomôcky pre kultiváciu kvasiniek**

Analytické váhy Boeco (SRN)  
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)  
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)  
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o. (ČR)  
Laminárny box Aura mini  
Spektrofotometer VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (UK)  
Trepačka IKA Yellow Line (SRN)

#### 4.2.2 Pomôcky pre izoláciu a analýzu karotenoidov

Filtre pre HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

Vodný kúpeľ EL-20, Merci a.s. (ČR)

Zostava HPLC/MS, Termo Fisher Scientific (USA)

Programátor gradientu GR 5, ECOM spol. s.r.o. (ČR)

Pumpa – MS Pump plus, Finnigan SURVEYOR

Vysokotlakové čerpadlo typ P 4020, ECOM spol. s.r.o. (ČR)

Dávkovací ventil typ C, ECOM spol. s.r.o. (ČR)

Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

Držiak predkolóny, KJO 4282 Supelco

Kolóna Kinetex C18; 2,6 µm; 4,6 x 150 mm; Phenomenex

Software Xcalibur – chromatography SW

Termostat kolóny typ LCO 101, ECOM spol. s.r.o. (ČR)

### 4.3 Použité kmene kvasiniek

#### 4.3.1 Karotenogenné kmene

*Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33

*Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26

*Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-31

*Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4

*Sporobolomyces pararoseus* CCY 19-9-6

*Sporobolomyces metaroseus* CCY 19-6-20

V nasledujúcom texte je *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33 označovaná ako *Rhodotorula glutinis* (S) a *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 ako *Rhodotorula glutinis* (N) z dôvodu lepšej prehľadnosti.

#### 4.3.2 Kmene produkujúce pulcherimín

*Metschnikowia pulcherrima* 145

*Metschnikowia pulcherrima* 147

*Metschnikowia pulcherrima* 149

*Metschnikowia andauensis* 129

### 4.4 Postup práce – produkcia karotenoidov

#### 4.4.1 Kultivácia vybraných rodov karotenogenných kvasiniek

Používané kvasinky rodu *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* sa radia medzi mezofilné aerobné mikroorganizmy, ktoré vykazujú podobné nároky na podmienky rastu. Kvasinky boli kultivované v tekutom médiu pri teplote 28 °C za neustáleho trepania a osvetlenia potrebného

pre produkciu karotenoidov. Sterilizácia médií prebiehala vždy v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút.

#### **4.4.1.1 Inokulum I**

Pre jednotlivé druhy kvasiniek bolo vždy pripravené jedno inokulum I o objeme 50 ml so zložením uvedeným v tabuľke 1. Za aseptických podmienok boli do každého vysterilizovaného inokula naočkované tri kľičky zásobnej kultúry jednotlivých druhov kvasiniek z Petriho misiek. Kultivácia inokula I prebiehala 24 hodín.

*Tabuľka 1: Zloženie inokula I*

<b>Zložka</b>	<b>Množstvo</b>
glukóza	40 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,34 g
kvasničný autolyzát	7 g
vodovodná voda	1000 ml

#### **4.4.1.2 Inokulum II**

Pre každé inokulum I bolo pripravené inokulum II o objeme 100 ml. Zloženie inokula II bolo zhodné so zložením inokula I uvedeným v tabuľke 1. Každé vysterilizované inokulum II bolo sterilne zaočkované inokulom I, a to tak, aby pomer objemov inokulum I : inokulum II bol 1:5. Kultivácia prebiehala 24 hodín.

#### **4.4.1.3 Produkčné média**

Pre každé inokulum II boli pripravené rôzne produkčné média o objeme 100 ml. Všetky produkčné média obsahovali rovnaký základ, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 2. Zložky, ktorými sa jednotlivé produkčné média líšili, sú uvedené v tabuľke 3.

*Tabuľka 2: Zloženie produkčného média – základ*

<b>Zložka</b>	<b>Množstvo</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
MgSO <sub>4</sub>	0,34 g
vodovodná voda	1000 ml



Tabuľka 3: Zloženie produkčného média

Označenie	Zloženie
kontrola	základ + glukóza 30 g/l
cestoviny	základ + cestoviny 38,96 g/l
2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	základ + glukóza 30 g/l + 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	základ + glukóza 30 g/l + 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
cestoviny + 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	základ + cestoviny 38,96 g/l + 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
cestoviny + 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	základ + cestoviny 38,96 g/l + 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Súčasťou každej série produkčných médií boli aj vaječné cestoviny využité ako hlavný zdroj uhlíka. Ich množstvo bolo stanovené, na základe znalosti nutričných hodnôt uvedených na cestovinách výrobcou, tak aby ich množstvo zodpovedalo množstvu glukózy prítomnej v kontrolnom médiu. Hodnota sacharidov obsiahnutých v 100 g cestovín činila 77 g.

77 g ..... 100 g  
 30 g ..... x g

$$x = \frac{30 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}}{77 \text{ g}} = 38,96 \text{ g}$$

Vysterilizované produkčné média boli asepticky zaočkované preliatím inokúl II, vždy tak aby pomer inokulum II : produkčné médium bol 1:5. Teda výsledný objem produkčných médií bol 120 ml. Kultivácia kultúr v produkčných médiách obsahujúcich glukózu prebiehala 80 hodín, pričom kultúry s obsahom cestovín v produkčných médiách boli kultivované po dobu 96 hodín.

#### 4.4.2 Stanovenie množstva biomasy turbimetricky

Množstvo biomasy bolo stanovené turbimetricky pomocou spektrofotometru. Z kvasinkovej kultúry bol odobraný 1 ml a nariedený tak, aby neprekročil rozsah detekcie spektrofotometra. Následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 630 nm. Ako blank bola použitá destilovaná voda, v prípade médií obsahujúcich cestoviny bolo ako blank použité toto médium bez buniek. Hodnoty absorbancií boli vztiahnuté na množstvo sušiny (g/l) podľa rovníc kalibračných kriviek zostrojených experimentálne pre jednotlivé kmene:

*Rhodotorula glutinis* (S)  $y = 0,1947x - 0,0234,$

*Rhodotorula glutinis* (N)  $y = 0,1317x + 0,1125,$

*Rhodotorula mucilaginosa*  $y = 0,1215x + 0,0115,$

*Sporobolomyces roseus*  $y = 0,2421x - 0,0488,$

*Sporobolomyces metaroseus*  $y = 0,1572x + 0,0191,$

*Sporobolomyces pararoseus*  $y = 0,1496x + 0,0786,$

kde y predstavuje spektrofotometricky nameranú absorbanciu a x vypočítané množstvo sušiny v g/l.

#### **4.4.3 Spracovanie biomasy**

Bolo odliatych 100 ml produkčného média a toto množstvo bolo zcentrifugované pri 5000 otáčkach za minútu po dobu 8 minút. Následne bol odliaty supernatant, bunky boli premyté destilovanou vodou a opäť zcentrifugované. Nakoniec bola biomasa rozsuspendovaná vo fyziologickom roztoku a uchovaná v mrazničke.

#### **4.4.4 Izolácia a extrakcia karotenoidov**

Súčasťou lipidickej frakcie membrány kvasinkových buniek sú karotenoidy aj ergosterol. Na ich izoláciu sa využíva niekoľkostupňová extrakcia spojená so zmydelnením. Vzorky uskladnené v mrazničke boli rozmrazené v studenej vode bez prístupu svetla. Po rozmrazení boli sцентрифugované pri 5000 otáčkach za minútu po dobu 8 minút a následne bol supernatant odliaty. Sediment obsahujúci bunky kvasiniek bol dezintegrovaný s 50 ml acetónu v trecej miske a kvantitatívne prevedený na odparovaciu miskú, do ktorej bolo tiež pridaných 50 ml 10% roztoku KOH. Zmydelňovanie celej zmesi prebiehalo vo vodnom kúpeli pri teplote 90 °C po dobu 30 minút.

Zo zmydelnenej suspenzie boli karotenoidy a ergosterol trikrát extrahované pomocou dietyléteru. Spojené éterové frakcie boli potom odparené na vákuovej odparke.

#### **4.4.5 Analýza karotenoidov – HPLC**

Vysušené vzorky po extrakcii boli rozpustené v 1 ml etanolu pre HPLC a prefiltrované cez jednorazové filtre do mikrocentrifugačných skúmaviek.

Chromatografická analýza karotenoidov prebiehala za izokratických podmienok pri prietoku mobilnej fáze 1 000 µl/min a teplote 45 °C. Ako mobilná fáza bol použitý metanol pre HPLC. K separácii bola použitá nerezová kolóna Kinetex C18 s predkolónou C18 za fotometrickej detekcie pri vlnovej dĺžke 450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre ergosterol a koenzým Q. Vybrané vlnové dĺžky odpovedajú maximu absorbie príslušnej analyzovanej látky. Vzorka bola dávkovaná na kolónu pomocou dávkovacieho ventilu, pričom objem nanášanej vzorky bol 20 µl.

K analýze karotenoidov bola použitá zostava HPLC od firmy Thermo Fisher Scientific, USA. K spracovaniu analytických dát a chromatogramov bol využitý chromatografický software Xcalibur.

#### **4.4.6 Identifikácia a kvantifikácia karotenoidov**

Identifikácia a kvantifikácia bola prevedená pomocou chromatografickej analýzy štandardov karotenoidov a tiež aj ergosterolu a koenzýmu Q pri daných vlnových dĺžkach. Množstvo vybraných karotenoidov bolo analyzované pomocou externej kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Na kvantitatívne stanovenie bola použitá závislosť plochy pík jednotlivých štandardov na koncentrácii.

## 4.5 Postup práce – produkcia pulcherimínu

Kvasinky rodu *Metschnikowia* sa radia k mezofilným aerobným mikroorganizmom. Všetky druhy tohto rodu boli kultivované pri teplote 28 °C. Sterilizácia médií prebiehala vždy v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút.

Následne po náraste kultúr bola produkcia pulcherimínu sledovaná vizuálne prostredníctvom farebných zmien. U niektorých kultúr bola prevedená detekcia pigmentu na základe pomeru intenzity špecifických pík (pre pulcherimín na 1400 cm<sup>-1</sup>) pomocou Ramanovej spektroskopie na Ústave prístrojovej techniky Akadémie vied Českej republiky.

### 4.5.1 Kultivácia v tekutom médiu

Všetky druhy rodu *Metschnikowia* boli kultivované v tekutom médiu s objemom 20 ml so zložením uvedeným v tabuľke 4. Za aseptických podmienok boli do každého vysterylizovaného média naočkované dve kľčky zásobnej kultúry jednotlivých druhov kvasiniek z Petriho misiek. Kultivácia prebiehala za neustáleho trepania po dobu 48 hodín.

Tabuľka 4: Zloženie média pre rod *Metschnikowia* – základ

Zložka	Množstvo
glukóza	20 g
bakteriologický peptón	5 g
kvasničný autolýzát	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
destilovaná voda	1000 ml

### 4.5.2 Kultivácia na tuhom médiu

Pre sledovanie zmien produkcie pigmentu boli jednotlivé druhy rodu *Metschnikowia* kultivované na tuhých médiách s rôznym zložením uvedeným v tabuľke 5. Jednotlivé sterilné média boli asepticky rozliate na Petriho misky. Po stuhnutí bola živná pôda zaočkovaná odobraním 0,1 ml vopred pripravenej kultúry z tekutého média rozterom. Následne boli Petriho misky uložené do termostatu a kultivované po dobu 72 hodín.

Tabuľka 5: Zloženie médií pre rod *Metschnikowia* kultivovaných na tuhých médiach

Označenie	Zloženie
Kontrola	základ
0,01 Fe	základ + FeCl <sub>3</sub> 0,01 g/l
0,05 Fe	základ + FeCl <sub>3</sub> 0,05 g/l
0,1 Fe	základ + FeCl <sub>3</sub> 0,1 g/l
Cu	základ + CuSO <sub>4</sub> 0,02 g/l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	základ + FeCl <sub>3</sub> 0,02 g/l + 2mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 4.6 Postup práce – antagonistický efekt kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Na štúdium antagonistického efektu pigmentu pulcherimínu produkovaného kvasinkami rodu *Metschnikowia* boli vybrané štyri mikroorganizmy. Prvým testovaným mikroorganizmom bola *Candida glabrata*, druh patogénnej kvasinky, ktorá je častým pôvodcom infekcie urogenitálneho traktu a krvného obehu. Ďalej bola použitá vláknitá biela plesň *Phanerochaete chrysosporium* významná produkciou extracelulárnych enzýmov degradujúcich lignín.

Väčšinu baktérii možno rozdeliť na dve veľké skupiny podľa Gramovho farbenia – grampozitívne a gramnegatívne baktérie. Rozdiel medzi týmito dvoma skupinami je predovšetkým v bunkovej stene, ktorá je u grampozitívnych buniek tvorená hrubou vrstvou peptidoglykánu a u gramnegatívnych je tvorená tenkou peptidoglykanovou a vonkajšou lipopolysacharidovou vrstvou [28].

Z tohto dôvodu boli ako ďalšie testované mikroorganizmy vybrané dva bakteriálne druhy, a to gramnegatívna baktéria *Escherichia coli* bežne žijúca v hrubom čreve teplokrvných živočíchov, ktorá môže byť za určitých podmienok patogénna a grampozitívna baktéria *Lactobacillus sakei*, ktorá hrá významnú rolu pri fermentácii masových výrobkoch.

##### 4.6.1 Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia*

Všetky druhy rodu *Metschnikowia* boli kultivované v tekutom médiu s objemom 20 ml, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 4. Za aseptických podmienok boli do každého vysterilizovaného média naočkované dve kličky zásobnej kultúry jednotlivých druhov kvasiniek z Petriho misiek. Kultivácia prebiehala za neustáleho trepania po dobu 48 hodín.

##### 4.6.2 Kultivácia vybraných testovaných mikroorganizmov

Pre každý testovaný mikroorganizmus bolo pripravené jedno tekuté médium s objemom 20 ml v 100 ml Erlenmayerovej bani, ktorého sterilizácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút. Za aseptických podmienok bolo každé sterilné médium zaočkované dvoma očkovacími kličkami zásobnej kultúry daného mikroorganizmu z Petriho misky. Kultivácia prebiehala za neustáleho trepania.

Po náraste kultúr v tekutých médiách boli pripravené pre každý testovaný mikroorganizmus štyri série tuhých médií na Petriho miskách, pričom každá séria bola tvorená štyrmi rôznymi tuhými médiami so zložením zhodným s médiami použitými pri

kultivácii daných mikroorganizmov v tekutom médiu, ktoré sú uvedené v tabuľke 7 – 10. Navzájom sa líšili prídavkom určitého množstva iónu kovu. Tieto zložky, ktorými sa jednotlivé tuhé média odlišovali od základného kultivačného, sú uvedené v tabuľke 6. Sterilizácia médií prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 45 minút. Jednotlivé sterilné média boli asepticky rozliate na Petriho misky. Po stuhnutí bola živná pôda zaočkovaná odobraním 0,1 ml pripravenej kultúry daného mikroorganizmu z tekutého média rozterom. Následne boli Petriho misky uložené do termostatu.

Tabuľka 6: Zloženie tuhých médií pre testované mikroorganizmy

Označenie	Množstvo
kontrola	kultivačné médium+ agar 20g/l
0,05 Fe	kultivačné médium + agar 20g/l + FeCl <sub>3</sub> 0,05 g/l
0,1 Fe	kultivačné médium + agar 20g/l + FeCl <sub>3</sub> 0,1 g/l
0,05 Cu	kultivačné médium + agar 20g/l + CuSO <sub>4</sub> 0,05 g/l

#### 4.6.2.1 Kultivácia kvasinky *Candida glabrata*

Kultivácia kvasinkového mikroorganizmu *Candida glabrata* prebiehala pri teplote 28 °C po dobu 24 hodín. Zloženie použitého kultivačného média je uvedené v tabuľke 7.

Tabuľka 7: Zloženie kultivačného média pre kvasinku *Candida glabrata*

Zložka	Množstvo
glukóza	40 g
bakteriologický peptón	10 g
kvasničný autolyzát	10 g
destilovaná voda	1000 ml

#### 4.6.2.2 Kultivácia plesne *Phanerochaete chrysosporium*

Kultivácia plesne *Phanerochaete chrysosporium* prebiehala pri teplote 37°C po dobu 5 dní. Zloženie použitého kultivačného média je uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8: Zloženie kultivačného média pre plesň *Phanerochaete chrysosporium*

Zložka	Množstvo
glukóza	20 g
bakteriologický peptón	20 g
kvasničný autolyzát	10 g
destilovaná voda	1000 ml

#### 4.6.2.3 Kultivácia baktérie *Escherichia coli*

Kultivácia gramnegatívnej baktérie *Escherichia coli* prebiehala pri teplote 35 °C po dobu 24 hodín. Zloženie použitého kultivačného média je uvedené v tabuľke 9.

Tabuľka 9: Zloženie kultivačného média pre baktériu *Escherichia coli*

Zložka	Množstvo
bakteriologický tryptón	10 g
kvasničný autolyzát	5 g
NaCl	5 g
destilovaná voda	1000 ml

#### 4.6.2.4 Kultivácia baktérie *Lactobacillus sakei*

Kultivácia grampozitívnej baktérie *Lactobacillus sakei* prebiehala pri teplote 35°C po dobu 24 hodín. Zloženie použitého kultivačného média je uvedené v tabuľke 10.

Tabuľka 10: Zloženie kultivačného média pre baktériu *Lactobacillus sakei*

Zložka	Množstvo
glukóza	20 g
bakteriologický peptón	10 g
hovädzí autolyzát	10 g
kvasničný autolyzát	4 g
octan sodný · 3 H <sub>2</sub> O	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
destilovaná voda	1000 ml

#### 4.6.3 Antagonistický efekt

Samotné testovanie antagonistického efektu bolo prevádzané na vopred pripravených tuhých médiách na Petriho miskách. Pre všetky štyri kmene kvasiniek rodu *Metschnikowia* boli pripravené štyri série Petriho misiiek, každá naočkovaná jednotlivými testovanými mikroorganizmami, pričom každá séria bola tvorená štyrmi Petriho miskami s rôznym zložením živného média. Do každého živného média obsahujúceho jednotlivé kultúry bola urobená jamka pomocou sterilnej špičky pipety. Následne bolo do týchto jamiek napipetovaných 40 µl jednotlivých druhov rodu *Metschnikowia*. Potom boli Petriho misky vložené do termostatu a inkubované pri teplote 30°C. Pri prejavení antimikrobiálnej aktivity pulcherimínu boli zaznamenané inhibičné zóny okolo každej jamky.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Morfológické, rastové a produkčné vlastnosti študovaných kvasiniek

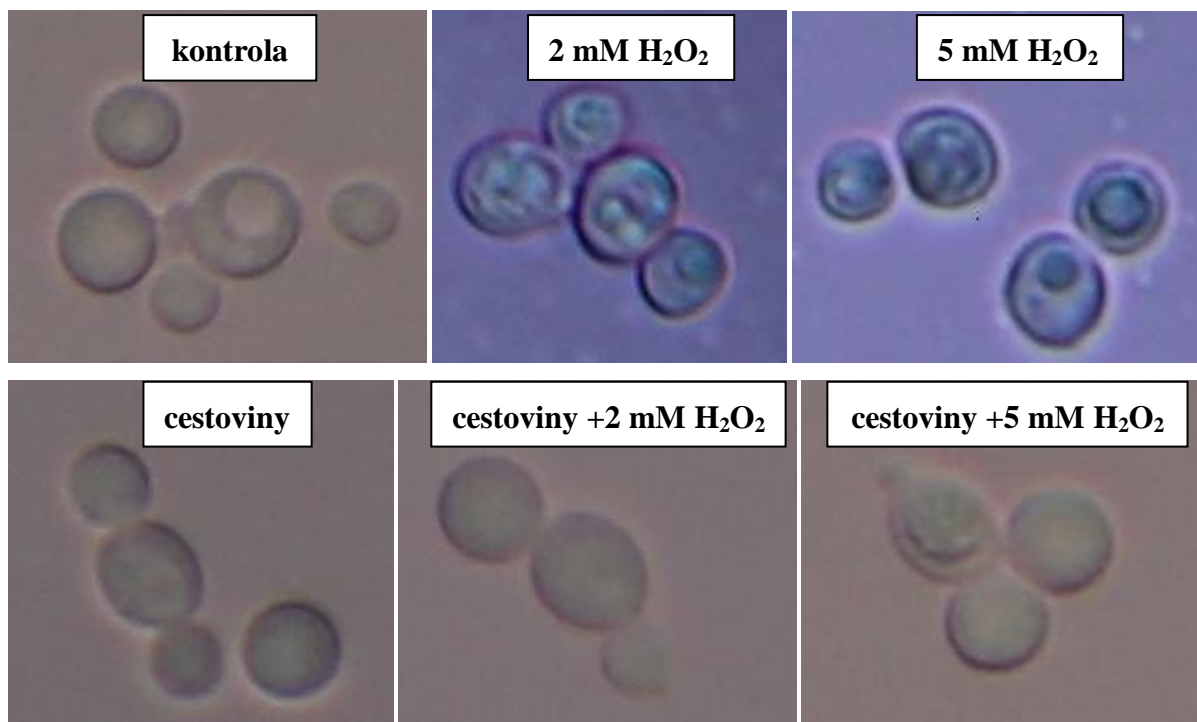
Na štúdium produkcie pigmentov a lipidických látok ovplyvnených pôsobením stresových faktorov v podobe prídavku rôznych koncentrácií peroxidu vodíka, jednak na základnom glukózovom médiu, a jednak aj pri použití odpadového substrátu – vaječných cestovín, boli použité kmene karotenogenných kvasiniek *Rhodotorula glutinis* (S), *Rhodotorula glutinis* (N), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces metaroseus* a *Sporobolomyces pararoseus*. Zloženie jednotlivých použitých médií a podmienky kultivácie sú uvedené v kapitole 4.4.

U všetkých vyššie spomenutých kvasinkových kultúr boli pozorované morfológické a rastové zmeny a tiež bola vyhodnotená produkcia biomasy, celkových karotenoidov, konkrétne  $\beta$ -karoténu pomocou HPLC. Ďalej boli sledované aj priemyselne významné lipidické látky ergosterol – provitamin A, ktorý je doprovodným metabolitom produkovaným súbežne s karotenoidmi a tiež koenzým Q – významný ako nutričný doplnok. Všetky získané produkčné parametre sú uvedené v nasledujúcich grafoch.

#### 5.1.1 *Rhodotorula glutinis* (S)

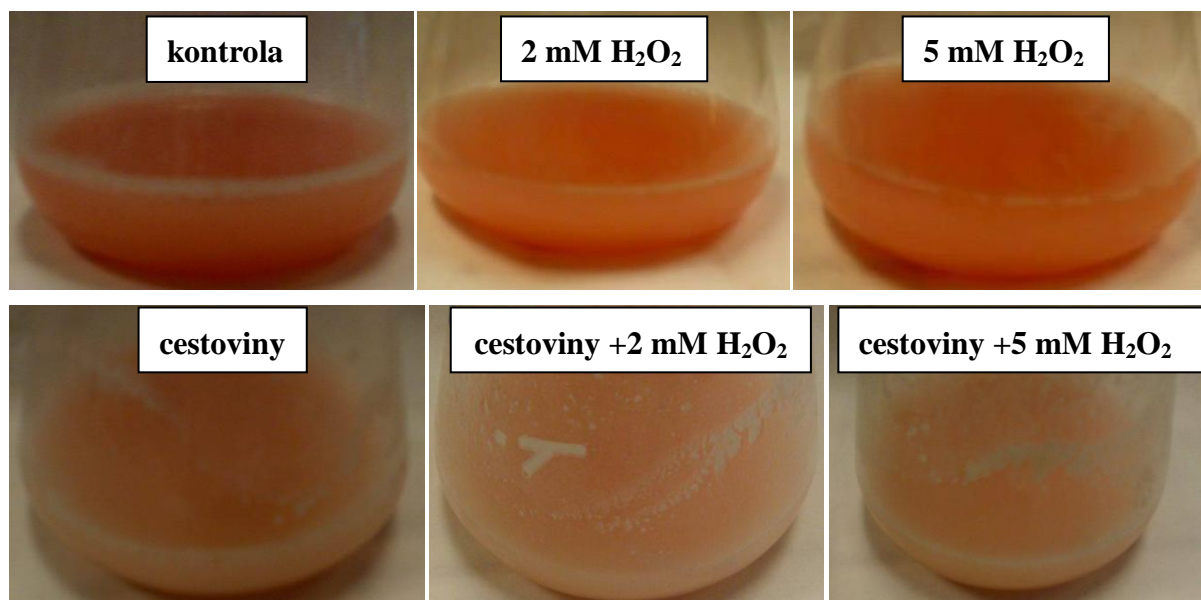
##### 5.1.1.1 Morfológické zmeny pozorované v rôznych produkčných médiách

V danej kultivácii boli pozorované morfológické charakteristiky kvasinky *Rhodotorula glutinis* (S) v závislosti od použitých produkčných médií s rôznym zložením. Kultivácia prebiehala súčasne na šiestich rôznych produkčných médiách.



Obrázok 15: Morfológické zmeny kmeňa *Rhodotorula glutinis* (S) v rôznych produkčných médiách

Z mikroskopického pozorovania možno vidieť vo všetkých prípadoch použitých produkčných médií guľatý až elipsoidný tvar buniek, ktorý je typický pre tento kmeň. Bunky sa v jednotlivých médiách od seba veľmi nelíšia, avšak v prípadoch, kde bolo použitých 5 mM peroxidu vodíka možno pozorovať mierne zhrubnutú bunkovú stenu ako odozva na stres.



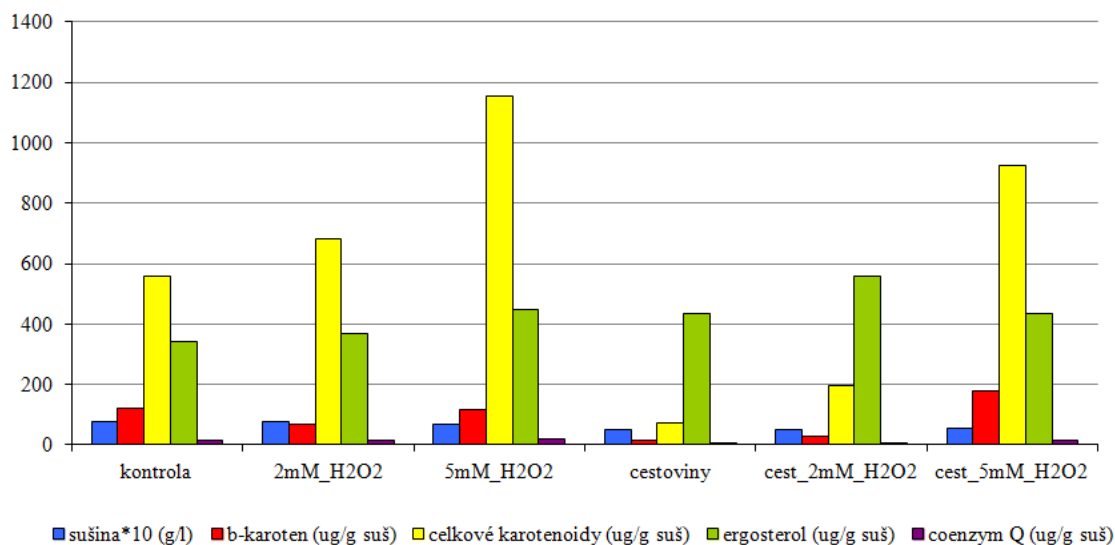
Obrázok 16: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Glukózové médiá mali oranžovú farbu, pričom intenzita sýtosti oranžovej farby sa zvyšovala s prídavkom peroxidu vodíka, a teda možno vidieť rozdiel, že médium obsahujúce 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  vykazuje najsýtejšie oranžové sfarbenie v porovnaní s kontrolou, čo naznačuje vyššiu produkciu karotenoidov. Zjavný rozdiel sfarbenia oproti glukózovým médiám, a teda aj kontrole, je možno pozorovať v médiách obsahujúcich cestoviny, kedy médium vo všetkých troch prípadoch bolo zakalené a malo ružové až mierne oranžové sfarbenie. Toto sfarbenie môže byť ovplyvnené rozkladom cestovín na škrobnaté produkty počas sterilizácie.



### 5.1.1.2 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách

#### *Rhodotorula glutinis* (S) 20-2-33



Obrázok 17: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Rhodotorula glutinis* (S) na rôznych produkčných médiách

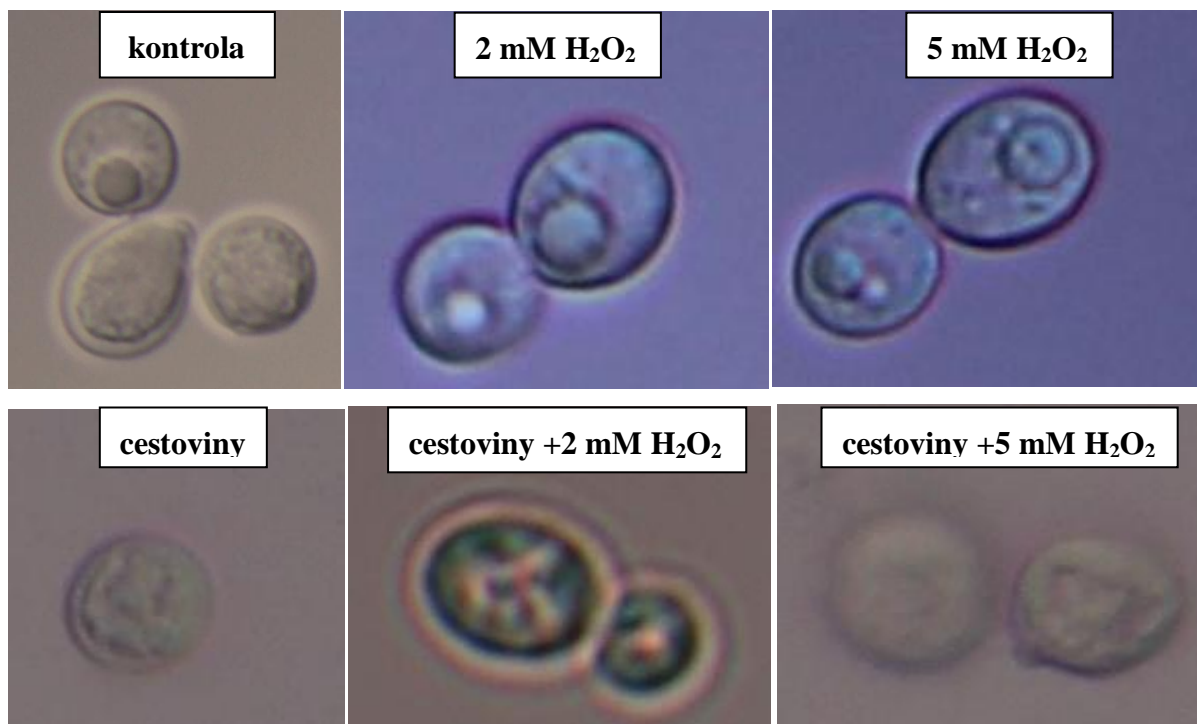
Pri kultivácii kvasinky *Rhodotorula glutinis* (S) bol zaznamenaný mierny nárast produkcie biomasy, skoro porovnateľný s kontrolným médiom, iba v prípade kultivácie na glukózovom médiu s prídavkom 2 mM peroxidu vodíka. V ostatných prípadoch produkčných médií boli hodnoty biomasy nižšie v porovnaní s kontrolným médiom. Pri analýze  $\beta$ -karoténu bol pozorovaný vyšší výťažok oproti kontrole iba v médiu obsahujúcom cestoviny s prídavkom 5 mM peroxidu vodíka. V oboch prípadoch substrátu použitého ako zdroj uhlíka bola sledovaná produkcia celkových karotenoidov, ktorá mala rastúci charakter so zvyšujúcou sa koncentráciou peroxidu vodíka spôsobujúceho bunke oxidačný stres. Maximum produkcie celkových karotenoidov bolo dosiahnuté v prípade glukózového média s prídavkom 5 mM peroxidu vodíka, a to dvojnásobne oproti kontrolnému médiu.

Produkcie ergosterolu kvasinkou v jednotlivých médiách sa navzájom významne nelíšili, avšak vo všetkých prípadoch bola jeho hodnota vyššia v porovnaní s kontrolou. Najvyšší výťažok ergosterolu bol pozorovaný v prípade cestovinového média s 2 mM peroxidom vodíka. Ďalej bola analyzovaná lipidická látka koenzým Q, ktorej produkcia sa mierne zvyšovala s prídavkom peroxidu vodíka, avšak vo všetkých prípadoch bola jeho hodnota nižšia ako vyprodukované množstvo v kontrolnom médiu.

### 5.1.2 *Rhodotorula glutinis* (N)

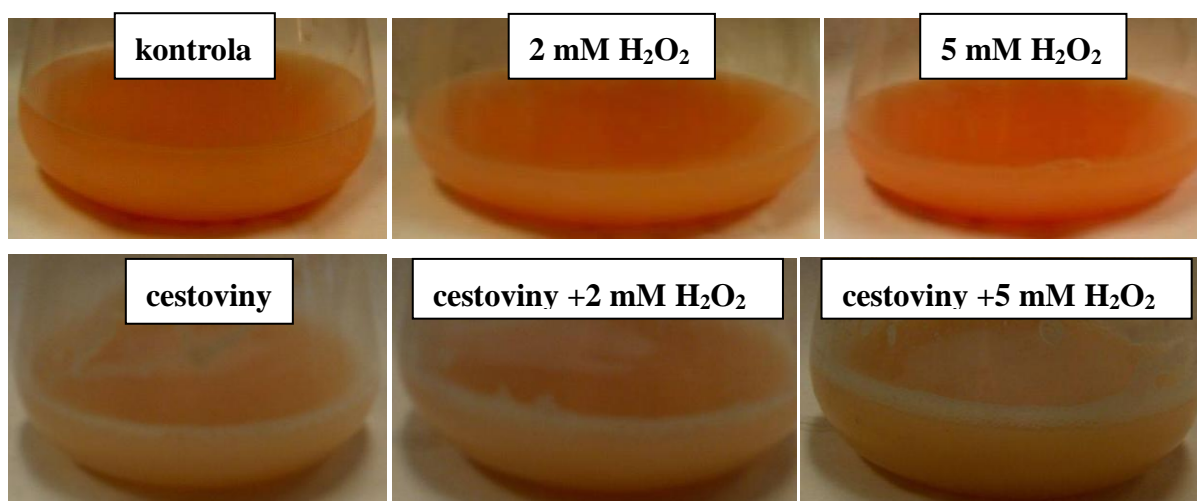
#### 5.1.2.1 Morfologické zmeny pozorované v rôznych produkčných médiách

V danej kultivácii bola pozorovaná morfológia kvasinky *Rhodotorula glutinis* (N) v závislosti od použitých produkčných médií s rôznym zložením. Kultivovalo sa súčasne na šiestich rôznych produkčných médiách.



Obrázok 18: Morfologické zmeny kmeňa *Rhodotorula glutinis* (N) v rôznych produkčných médiách

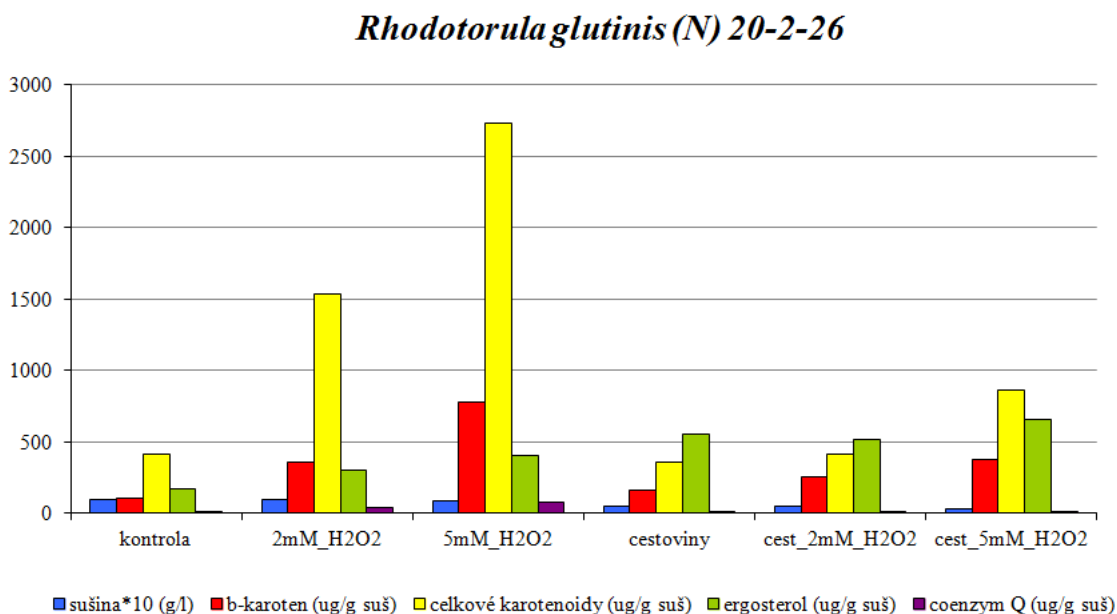
Tvar buniek u kvasinky *Rhodotorula glutinis* (N) v kontrolnom médiu je guľatý až elipsoidný. Tomuto tvaru odpovedajú aj bunky vo všetkých ostatných médiách, avšak veľkosť buniek v médiách obsahujúcich peroxid vodíka je nepatrne väčšia. V glukózových médiách obsahujúcich peroxid vodíka vidieť veľké vakuoly, ktoré sú typické pre staršie bunky v stacionárnej fáze rastu. Ďalšie zmeny oproti kontrolnému médiu možno pozorovať v cestovinovom médiu s 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kde bunky majú výrazne zhrubnutú bunkovú stenu a tiež vidieť jemné zvrásnenie buniek v cestovinovom médiu s prídavkom 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tieto morfologické zmeny boli pravdepodobne vyvolané oxidačným stresom spôsobeným peroxidom vodíka.



Obrázok 19: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Všetky tri glukózové média majú oranžové sfarbenie, avšak médium obsahujúce 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa odlišuje výrazne sýtejšou farbou, čo nasvedčuje zvýšenej produkcii karotenoidov. Výraznú zmenu oproti kontrolnému médiu mali ružovo až bledooranžovo sfarbené cestovinové média, dokonca v cestovinovom médiu s 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bola farba žltá, čo môže súvisieť so syntézou odlišných pigmentov.

#### 5.1.2.2 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách



Obrázok 20: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Rhodotorula glutinis* (N) na rôznych produkčných médiách

Z hľadiska produkcie biomasy kvasinkou *Rhodotorula glutinis* (N) bola najvyššia hodnota produkcie zaznamenaná v kontrolnom médiu. Biomasa získaná v glukózových médiách bola skoro zrovnateľná s kontrolou, ale nižšia a v cestovinových médiách bola jej hodnota najnižšia.

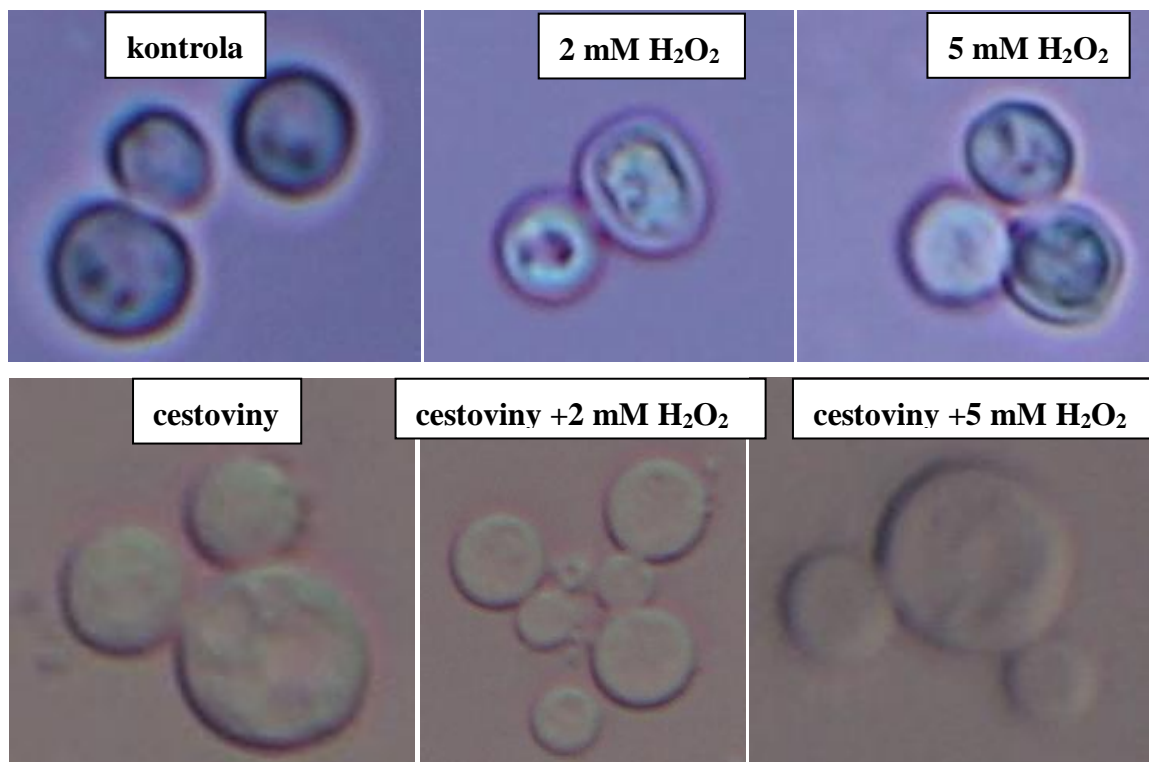
Z grafu možno na prvý pohľad vidieť pozitívny vplyv stresových faktorov na produkciu tak ako  $\beta$ -karoténu tak aj celkových karotenoidov. Kvasinky sa pravdepodobne bránili oxidačnému stresu spôsobenému prídavkom peroxidu vodíka vyššou akumuláciou ochranných metabolitov, ktorými sú práve sledované pigmenty. Najvyššia produkcia oboch týchto sledovaných metabolitov, až sedemnásobne vyššia v porovnaní s kontrolou, vykazovala kvasinka pri kultivácii na glukózovom médiu s prídavkom 5 mM peroxidu vodíka.

Produkcia ergosterolu dosahovala v jednotlivých produkčných médiách vždy vyššie hodnoty ako v kontrolnom médiu. Najvyššie produkcie boli dosiahnuté v médiách s prídavkom cestovín, konkrétne maximum ergosterolu bolo vyprodukované v cestovinovom médiu s 5 mM peroxidom vodíka. Naopak, využitie cestovín ako substrátu sa neukázalo ako pozitívne v prípade produkcie koenzýmu Q, ktorého hodnoty boli najvyššie pri použití glukózy.

### 5.1.3 *Rhodotorula mucilaginosa*

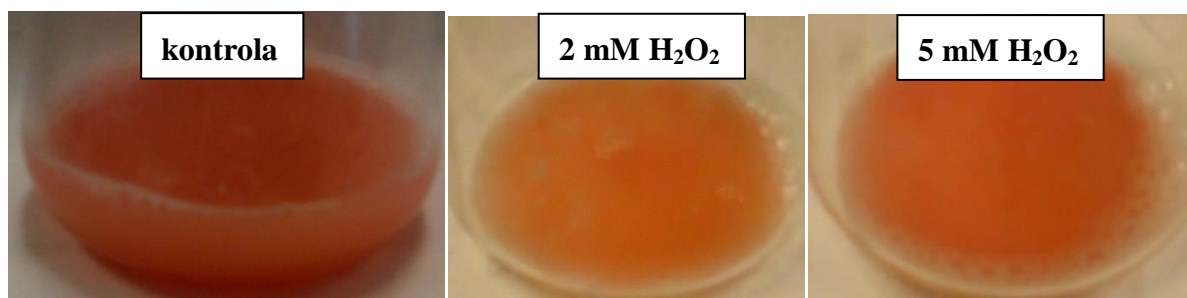
#### 5.1.3.1 Morfologické zmeny pozorované v rôznych produkčných médiách

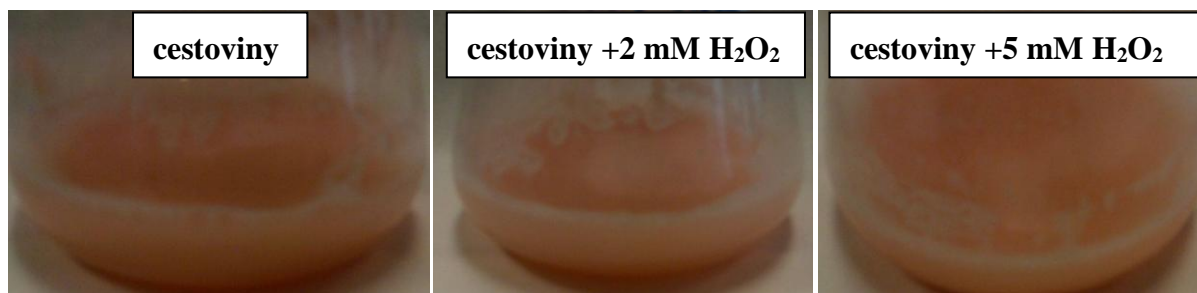
V danej kultivácii boli pozorované morfologické zmeny kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* v závislosti na použitých produkčných médiách s rôznym zložením. Jednotlivé produkčné média boli kultivované za rovnakých podmienok.



Obrázok 21: Morfologické zmeny kmeňa *Rhodotorula mucilaginosa* v rôznych produkčných médiách

Kontrolné médium obsahovalo bunky guľatého až mierne oválneho tvaru bez iných atypických znakov. Odlišnosti v porovnaní s bunkami v kontrolnom médiu je možno vidieť v každom z použitých médií. Viditeľne väčšie bunky sa vyskytovali v cestovinovom médiu jednak bez peroxidu vodíka, ale aj pri 5 mM koncentrácii H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Niektoré bunky v oboch glukózových médiách s prídavkom peroxidu vodíka mali mierne zhrubnutú bunkovú stenu a v cestovinovom médiu s 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa bunky začali zhlukovať. Zhrubnutá bunková stena či zhlukovanie buniek sú typickým znakom ochrany proti oxidačnému stresu.



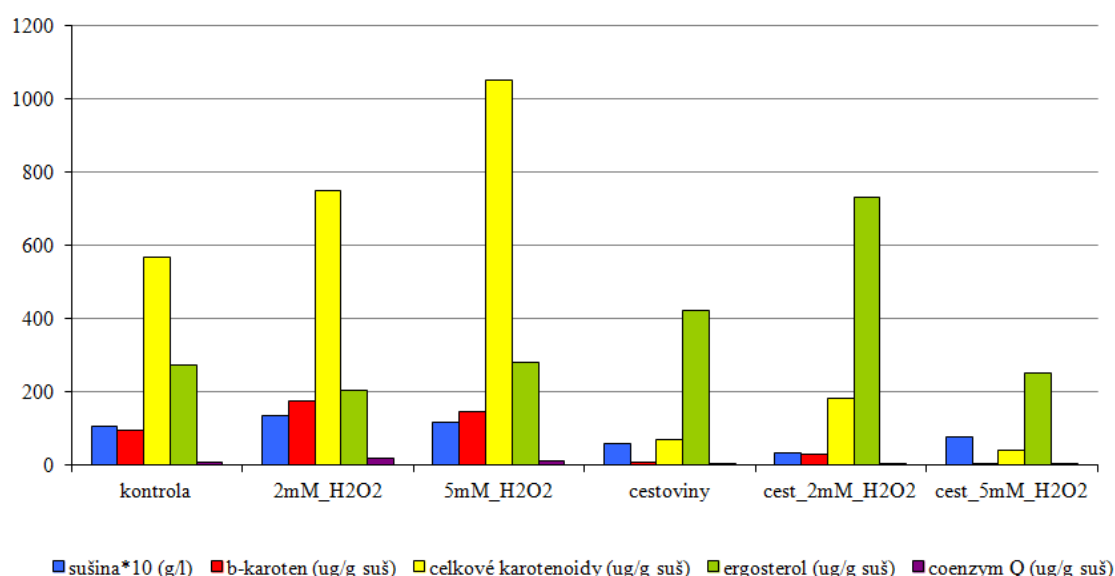


Obrázok 22: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Na prvý pohľad možno skonštatovať rozdiel sýtosti sfarbenia glukózových médií s prídavkom peroxidu vodíka od kontrolného média s oranžovým sfarbením. Glukózové médium s 2 mM  $H_2O_2$  malo jasnú oranžovú farbu, dokonca u média s 5 mM  $H_2O_2$  bola pozorovaná sýta tmavooranžová farba, čo napovedá nadprodukcii pigmentov. Všetky tri cestovinové média mali svoje typické bledoružové až bledooranžové sfarbenie.

### 5.1.3.2 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách

#### *Rhodotorula mucilaginosa* 20-7-31



Obrázok 23: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Rhodotorula mucilaginosa* na rôznych produkčných médiách

Produkcia biomasy u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* dosahovala najvyššie množstvá v rámci študovaných kmeňov rodu *Rhodotorula*. V grafe možno vidieť mierne zvýšenú produkciu pôsobením peroxidu vodíka v glukózových médiách v porovnaní s kontrolou, pričom najvyššia hodnota po pridaní 2 mM koncentrácie peroxidu vodíka činila 13,47 g/l.

V produkcii  $\beta$ -karoténu boli dosiahnuté najvyššie výtťažky na glukózových médiách, konkrétne najvyšší výtťažok bol získaný pri kultivácii na glukózovom médiu s 2 mM peroxidom vodíka. Z výsledkov možno vidieť negatívny vplyv cestovín na produkciu  $\beta$ -karoténu a taktiež celkových karotenoidov, kde sú ich hodnoty až dvadsaťnásobne nižšie

v porovnaní s kontrolou. Pri sledovaní produkcie celkových karotenoidov bol zaznamenaný ich významný nárast pridaním 5 mM koncentrácie peroxidu vodíka do glukózového média.

Naopak, prevažne na cestovinových médiách možno pozorovať vyššie výťažky ergosterolu v porovnaní s kontrolou. Maximum produkcie ergosterolu, ktoré predstavovalo trojnásobok množstva v kontrolnom médiu, bolo v cestovinovom médiu s prídavkom 2 mM peroxidu vodíka. *Rhodotorula mucilaginosa* nevykazovala obzvlášť výrazné nadprodukcie koenzýmu Q. Mierne zvýšené výťažky oproti kontrole boli pozorované na glukózových médiách s peroxidom vodíka, vyššia hodnota bola pri 2 mM koncentrácii.

Z jednotlivých čiastkových výsledkov možno konštatovať, že pôsobením oxidačného stresu v podobe peroxidu vodíka, kvasinky rodu *Rhodotorula* vykazovali nadprodukčné vlastnosti. Jediná výnimka bola zaznamenaná v produkcii biomasy kvasinkou *Rhodotorula glutinis* (N), kde pri prídavku peroxidu vodíka boli výťažky nižšie ako v kontrolnom médiu, avšak nie veľmi výrazne. Najvyšší výťažok biomasy bol vyprodukovaný kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa* (11,66 g/l), a to práve použitím 2 mM koncentrácie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Napriek tomu, že peroxid vodíka nespôsobil zvýšenie produkciu biomasy u kvasinky *Rhodotorula glutinis* (N), na akumuláciu karotenoidov a koenzýmu Q mal významný vplyv. Konkrétne 5 mM koncentrácia peroxidu vodíka viedla k najvyšším produkciám β-karoténu (780,24 μg/g), celkových karotenoidov (2732,51 μg/g) a koenzýmu Q (79,12 μg/g) v rámci všetkých študovaných kmeňov kvasiniek rodu *Rhodotorula*.

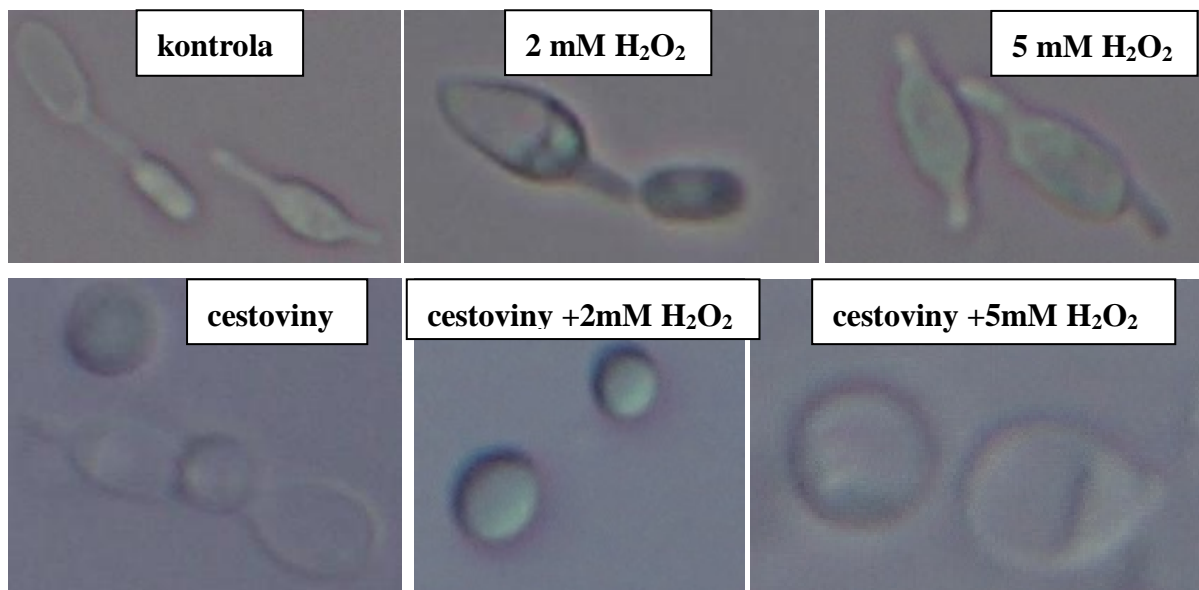
Ďalej je nutné poznamenať, že výrazné nižšie produkcie biomasy, karotenoidov a koenzýmu Q boli zaznamenané pri použití médií obsahujúce cestoviny ako hlavný zdroj uhlíka v porovnaní s glukózovými. Tieto nízke produkcie mohli byť spôsobené nedostatkom potrebných jednoduchých sacharidov obsiahnutých v médiách. Na druhej strane, cestovinové médium sa javí ako vhodný substrát podporujúci produkciu ergosterolu a tento trend bol zaznamenaný u všetkých študovaných kmeňov kvasiniek rodu *Rhodotorula*. Táto zvýšená produkcia ergosterolu na cestovinových médiách bola pravdepodobne spôsobená tým, že použité vaječné cestoviny obsahovali okrem uhlíka aj významné množstvo dusíka a tiež aj iných látok absentujúcich pri použití glukózy ako zdroju uhlíka, čo mohlo viesť k syntéze odlišných metabolitov. Maximálny výťažok ergosterolu (730,4 μg/g) bol zaznamenaný u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*.

#### **5.1.4 *Sporobolomyces roseus***

##### **5.1.4.1 *Morfologické zmeny pozorované v rôznych produkčných médiách***

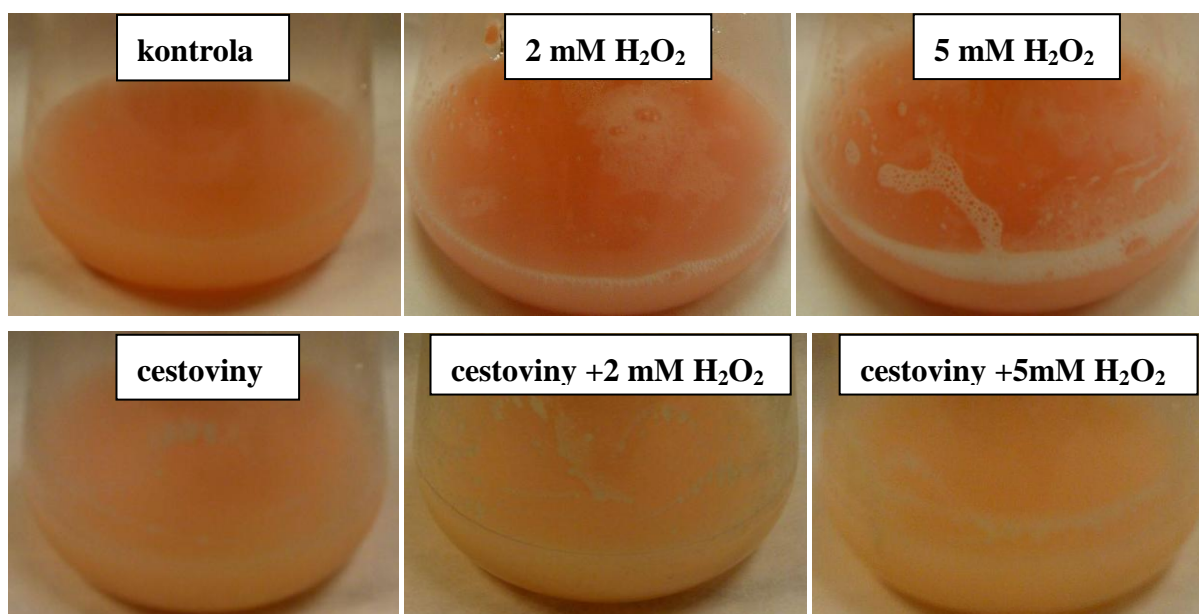
V danej kultivácii boli pozorované morfologické charakteristiky kvasinky *Sporobolomyces roseus* v závislosti od použitých produkčných médií s rôznym zložením. Kultivácia prebiehala súčasne na šiestich rôznych produkčných médiách.





Obrázok 24: Morfologické zmeny kmeňa *Sporobolomyces roseus* v rôznych produkčných médiách

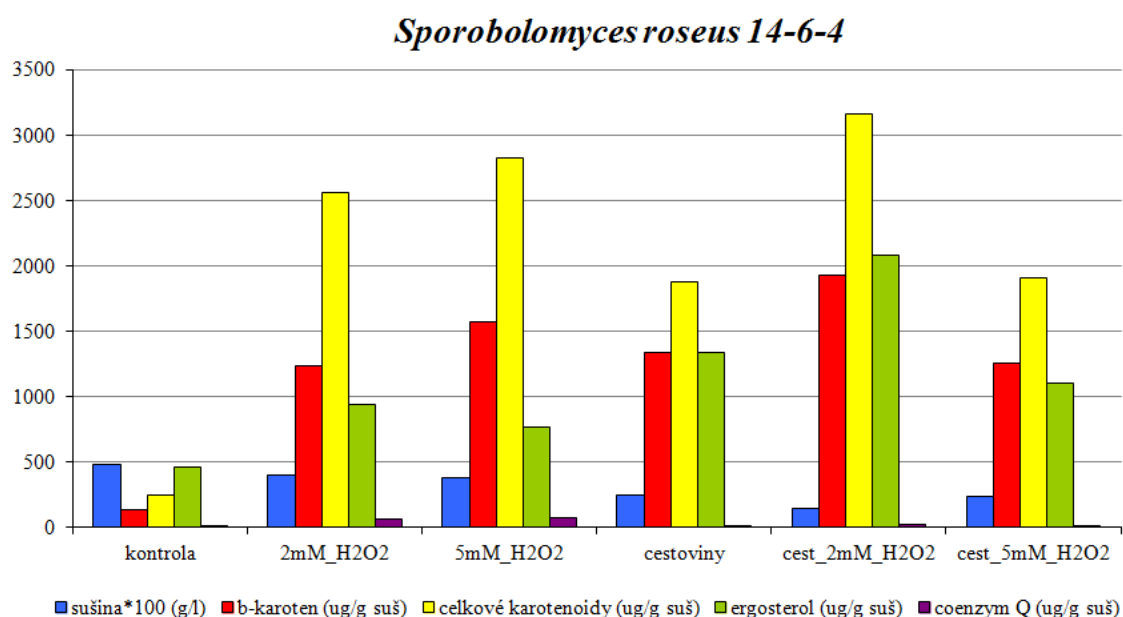
Bunky kvasinky *Sporobolomyces roseus* sa svojím tvarom, ktorý je elipsoidný až pretiahnutý, často citrónový, výrazne odlišujú od ostatných študovaných kmeňov. Bunky v glukózových médiách sa nijak výrazne neodlišovali od kontrolného. Naopak, tvar buniek v cestovinových médiách bol skôr oválny až guľatý, pričom najvýraznejšiu zmenu možno pozorovať v tvare buniek v cestovinovom médiu s prídavkom 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čo bolo pravdepodobne vyvolané snahou kvasinky adaptovať sa na nové kultivačné podmienky.



Obrázok 25: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Glukózové média mali oranžovú až bledoružovú farbu, ktorá sa navzájom veľmi nelíšila. Cestovinové média sa odlišovali od kontrolného média, no nie až tak výrazne ako v predchádzajúcich prípadoch u kvasiniek rodu *Rhodotorula*. Ich sfarbenie bolo bledooranžové v prípade prídavku peroxidu vodíka bledooranžové až bledožlté.

#### 5.1.4.2 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách



Obrázok 26: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Sporobolomyces roseus* na rôznych produkčných médiách

Kvasinka *Sporobolomyces roseus* vykazovala najvyšší výtťažok biomasy v kontrolnom médiu. V glukózových médiách bola hodnota biomasy podobná ako v kontrolnom, v cestovinových médiách nižšia. Produkcie  $\beta$ -karoténu boli vysoké vo všetkých produkčných médiách až 9-14násobne vyššie v porovnaní s kontrolou. Najvyšší výtťažok  $\beta$ -karoténu bol dosiahnutý pri kultivácii kvasinky na cestovinovom médiu s prídavkom 2 mM peroxidu vodíka, kde rovnako pozorujeme aj maximálny nárast celkových karotenoidov. Rovnako vidieť aj výraznú nadprodukciu celkových pigmentov v porovnaní s kontrolou, pričom opäť ich najvyššia produkcia bola zaznamenaná na cestovinovom médiu s 2 mM koncentráciou peroxidu vodíka.

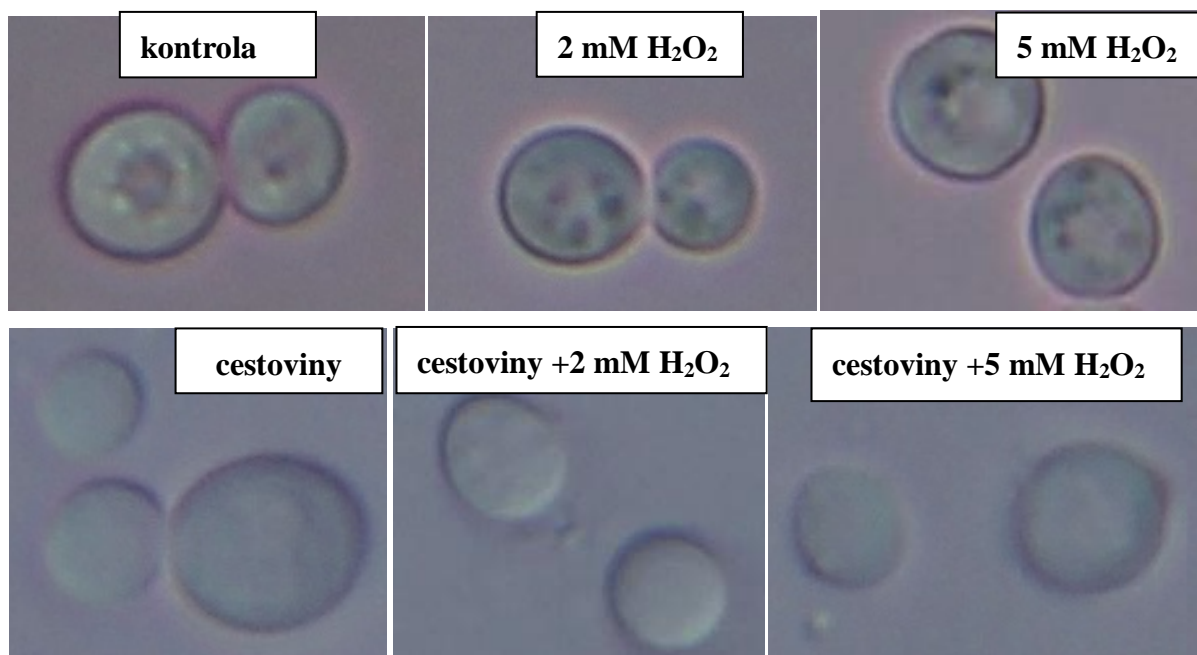
Výrazná nadprodukcija ergosterolu bola pozorovaná najmä na cestovinových médiách a tiež možno sledovať nárast produkcie pri prídavku 2 mM peroxidu vodíka. Vyššia koncentrácia  $H_2O_2$  viedla k zníženiu produkcie. Z toho vyplýva, že najvyššia produkcia ergosterolu bola v cestovinovom médiu s 2 mM peroxidom vodíka. Pri sledovaní produkcie koenzýmu Q je najmä na glukózových médiách vidieť priaznivý vplyv prídavku peroxidu vodíka ako stresového faktoru, kde boli dosiahnuté vyššie produkcie oproti kontrole. Najvyšší výtťažok bol dosiahnutý na glukózovom médiu s 5 mM peroxidom vodíka a to skoro až 7násobne vyšší ako v kontrolnom médiu.

#### 5.1.5 *Sporobolomyces metaroseus*

##### 5.1.5.1 Morfologické zmeny pozorované v rôznych produkčných médiách

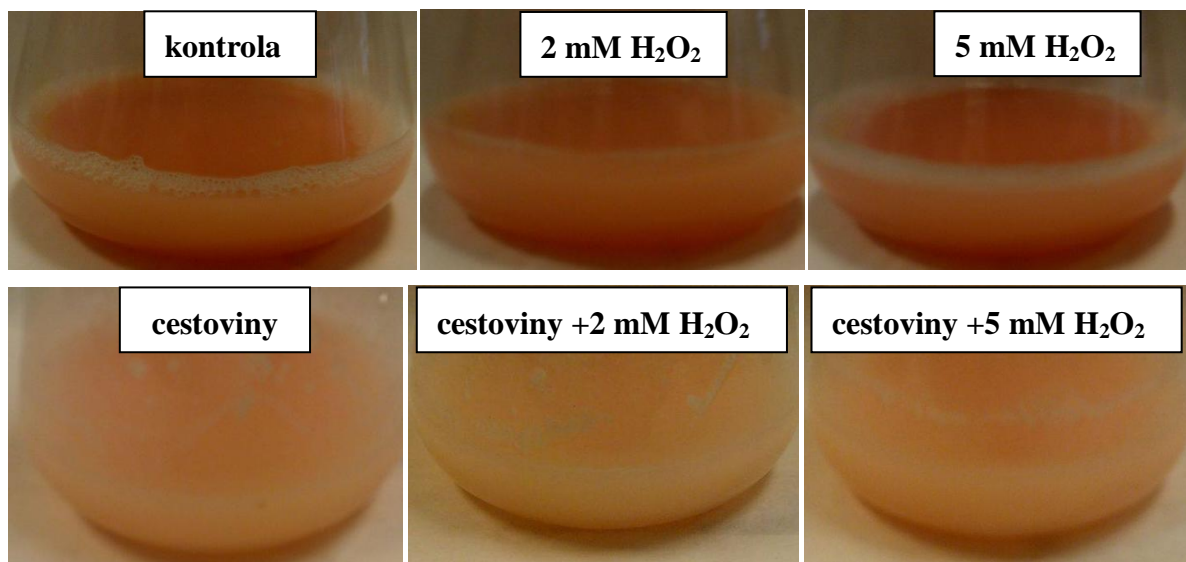
V danej kultivácii bola pozorovaná morfológia kvasinky *Sporobolomyces metaroseus* v závislosti na použitých produkčných médiách s rôznym zložením. Kultivácia prebiehala súčasne na šiestich rôznych produkčných médiách.





Obrázok 27: Morfologické zmeny kmeňa *Sporobolomyces metaroseus* v rôznych produkčných médiách

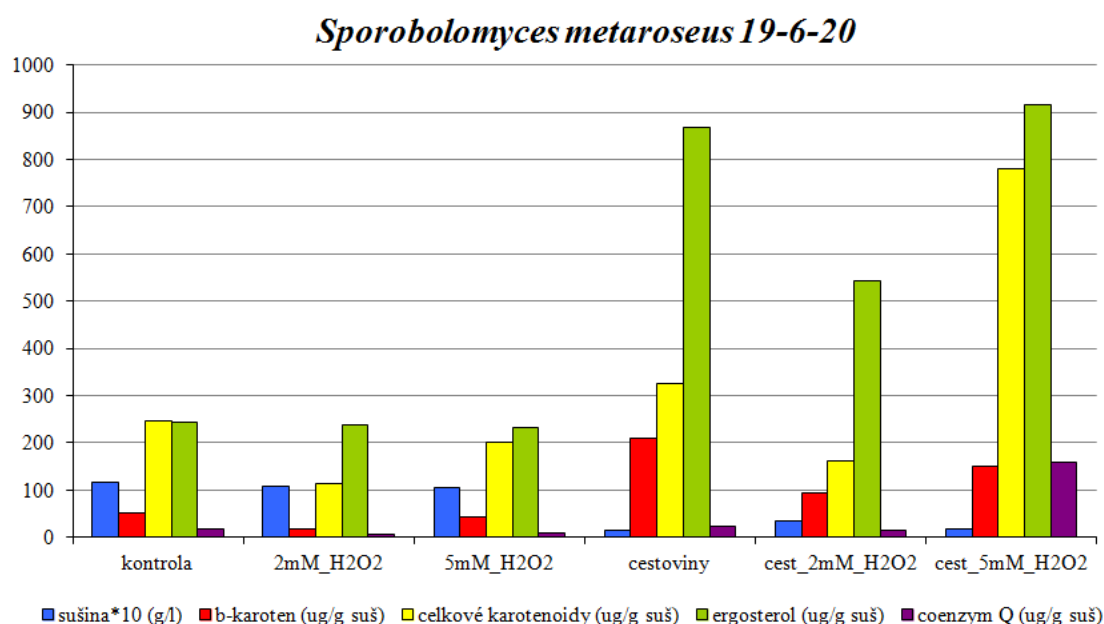
V pozorovaní morfológie kmeňa *Sporobolomyces metaroseus* možno vidieť, že tvar buniek je guľatý až mierne oválny. Bunky v jednotlivých médiách sa od seba výrazne neodlišujú.



Obrázok 28: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Tak ako aj pri mikroskopickom pozorovaní neboli zaznamenané žiadne výrazné zmeny v morfológii buniek v porovnaní s kontrolou, tak ani v prípade vizuálneho pozorovania sfarbenia jednotlivých médií neboli pozorované žiadne značné odlišnosti v rámci glukózových médií. Cestovinové média mali opäť svoje typické bledoružové až bledooranžové sfarbenie.

### 5.1.5.2 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách



Obrázok 29: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Sporobolomyces metaroseus* na rôznych produkčných médiách

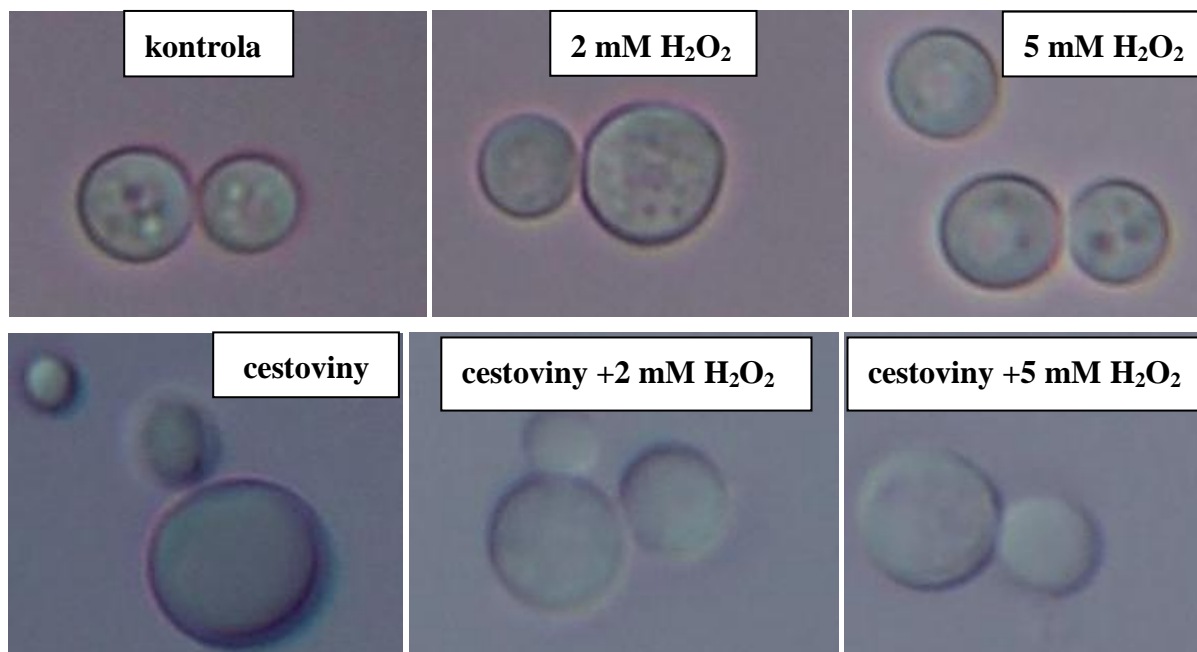
Z výsledkov analýzy produkcie biomasy kvasinkou *Sporobolomyces metaroseus* nebolo v žiadnom z produkčných médií dosiahnutého vyššieho výťažku ako v kontrolnom médiu. Čo sa týka glukózových médií, produkcie biomasy boli veľmi podobné kontrole, avšak v médiách obsahujúcich cestoviny bol zaznamenaný vyšší pokles biomasy.

Analýza karotenoidov ukázala pozitívny vplyv produkcie ako aj  $\beta$ -karoténu tak aj celkových pigmentov pri kultivácii kvasinky v cestovinových médiách v porovnaní s kontrolným médiom. Najvyšší výťažok  $\beta$ -karoténu bol zaznamenaný v cestovinovom médiu bez peroxidu vodíka. Na druhej strane, cestovinové médium s prídavkom 5mM peroxidu vodíka bolo najpriaznivejším prostredím pre produkciu celkových karotenoidov.

Podobne tak mali cestovinové médiá pozitívny vplyv aj na produkciu ergosterolu. Maximum ergosterolu bolo vyprodukované v médiu obsahujúcom cestoviny s 5 mM koncentraciou peroxidu vodíka v množstve 4násobne väčšom ako v kontrolnom. V tomto médiu bol takisto zaznamenaný výrazný nárast koenzýmu Q, ktorý činil skoro 10násobok v porovnaní s kontrolou, pričom ostatné média nevykazovali výrazné odchýlky.

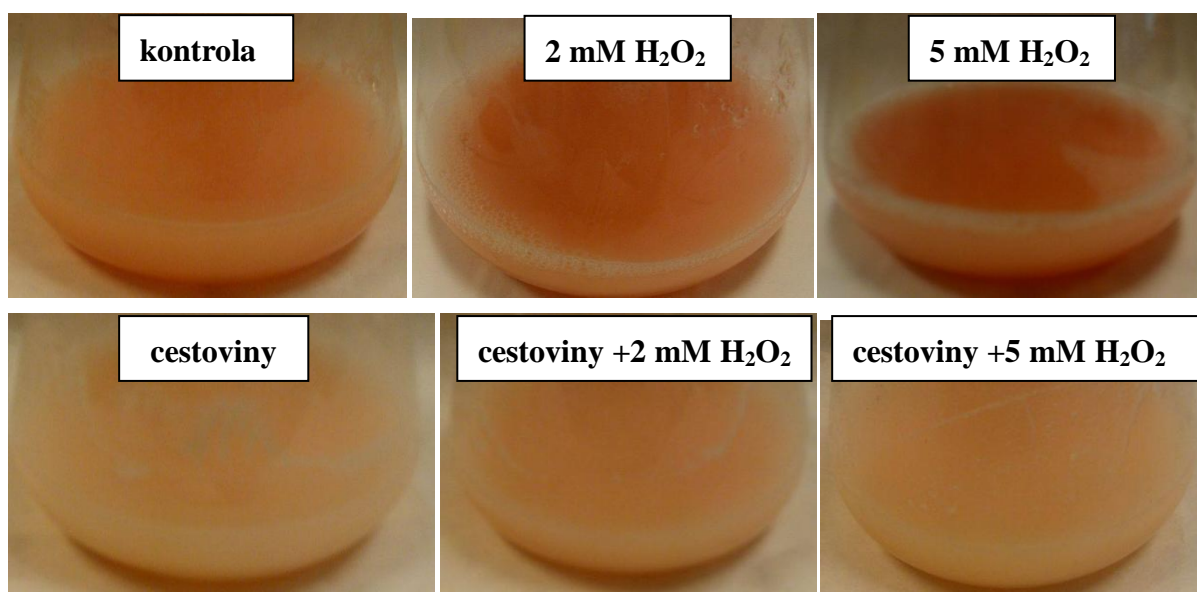
### 5.1.6 *Sporobolomyces pararoseus*

V danej kultivácii boli pozorované morfológické charakteristiky kvasinky *Sporobolomyces pararoseus* v závislosti na použitých produkčných médiách s rôznym zložením. Kultivácia prebiehala súčasne na šiestich rôznych produkčných médiách.



Obrázok 30: Morfologické zmeny kmeňa *Sporobolomyces pararoseus* v rôznych produkčných médiách

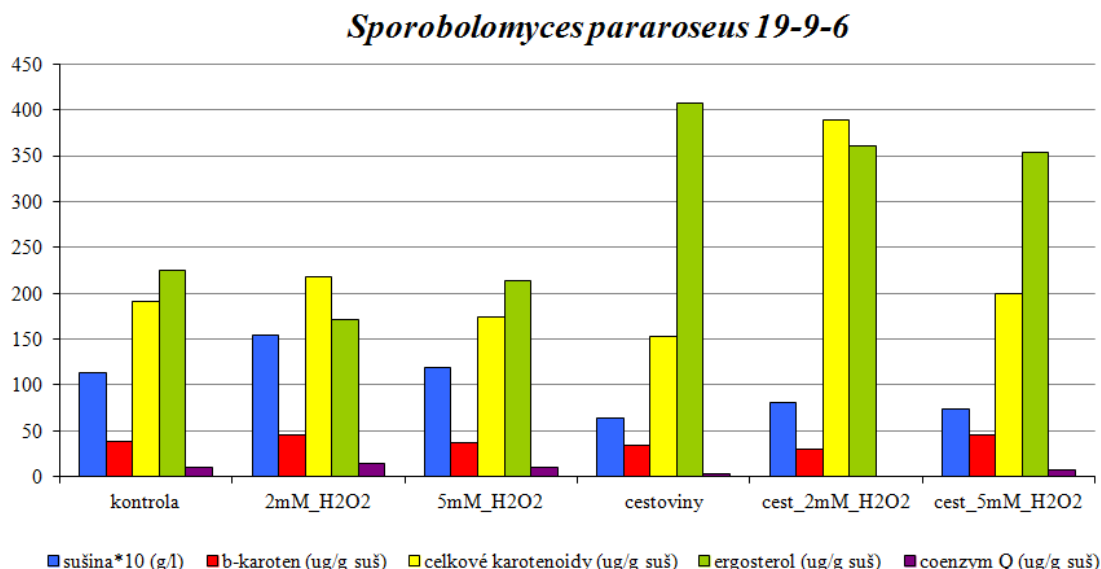
Bunky kvasinky *Sporobolomyces pararoseus* sú vo všetkých použitých produkčných médiách viac-menej guľatého tvaru bez výrazných odlišností. Možno však poukázať na nepatrne väčšie bunky vo všetkých produkčných médiách v porovnaní s kontrolným



Obrázok 31: Zmeny v sfarbení rôznych produkčných médií

Zmeny v zafarbení produkčných médií pri použití glukózy nie sú viditeľné. Produkčné média, kde boli použité cestoviny ako odpadný substrát sú bledooranžovej farby, tiež bez výrazných zmien.

### 5.1.6.1 Produkčné vlastnosti pozorované v rôznych produkčných médiách



Obrázok 32: Graf znázorňujúci produkciu biomasy, karotenoidov a lipidických látok kmeňom *Sporobolomyces pararoseus* na rôznych produkčných médiách

U kvasinky *Sporobolomyces pararoseus* boli dosiahnuté najvyššie produkcie biomasy spomedzi všetkých študovaných kmeňov. V porovnaní s kontrolným médiom boli výťažky biomasy nižšie v prípade médií obsahujúcich cestoviny, naopak glukózové média s prídavkom peroxidu vodíka vykazovali jej nárast, konkrétne hodnota biomasy produkovaná na glukózovom médiu s 2 mM peroxidu vodíka bola najvyššia.

Produkcie  $\beta$ -karoténu v jednotlivých produkčných médiách boli nižšie, viac-menej zrovnateľné s kontrolou, výnimku tvorili dve média – glukózové médium s 2 mM peroxidom vodíka a cestovinové médium s 5 mM peroxidom vodíka, kde bolo množstvo  $\beta$ -karoténu mierne zvýšené oproti kontrole. Aj napriek relatívne nízkym množstvám  $\beta$ -karoténu, táto kvasinka však vykazovala na jednotlivých produkčných médiách vyššie produkcie celkových karotenoidov, na základe čoho možno skonštatovať, že kvasinka je schopná produkovať iné typy pigmentov ako napríklad torulén alebo torularhodín. Najvyšší výťažok celkových pigmentov bol zaznamenaný v cestovinovom médiu s 2 mM peroxidom vodíka.

V porovnaní s kontrolným médiom boli dosiahnuté nadprodukčné množstvá ergosterolu v médiách obsahujúcich cestoviny, pričom maximálny výťažok bol dosiahnutý v cestovinovom médiu bez prídavku peroxidu vodíka.

Na rozdiel od študovaných kvasiniek rodu *Rhodotorula*, vybrané kmene rodu *Sporobolomyces* boli schopné lepšieho využívania cestovín pridaných ako hlavný zdroj uhlíka a na tomto médiu vykazovali zvýšené produkcie najmä karotenoidov a ergosterolu. Všeobecne možno konštatovať, že kvasinky rodu *Sporobolomyces* vykazovali lepšie produkčné vlastnosti všetkých sledovaných metabolitov v porovnaní s rodom *Rhodotorula*. Prvenstvo v produkcii biomasy (15,5 g/l) mala kvasinka *Sporobolomyces pararoseus*, avšak na úkor produkcie karotenoidov a sledovaných lipidických látok. Ako už bolo spomenuté,

výrazná nadprodukcia betakaroténu (1923,78 µg/g), celkových karotenoidov (3160,75 µg/g) a tiež aj ergosterolu (2078,94 µg/g) bola dosiahnutá na cestovinovom médiu v kombinácii s 2 mM peroxidom vodíka ako stresového faktoru u kvasinky *Sporobolomyces roseus*. Čo sa týka najvyššieho výťažku koenzýmu Q (157,55 µg/g), ten bol zaznamenaný u kvasinky *Sporobolomyces metaroseus*.

## 5.2 Pulcherimín

Ďalšia časť experimentálnej práce bola venovaná sledovaniu produkcie pulcherimínu v závislosti na prítomnosti rôznych zložiek – iónov kovov a peroxidu vodíka v médiu. Na tento experiment boli použité kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia pulcherrima* 149 a *Metschnikowia andauensis* 129 schopné tvorby pulcherimínu. Zloženie jednotlivých použitých médií a podmienky kultivácie sú uvedené v kapitole 4.5.

U všetkých vyššie spomenutých kvasinkových kultúr rodu *Metschnikowia* boli vizuálne pozorované zmeny v sfarbení v závislosti na použítom médiu a u niektorých kmeňov bola tiež prevedená identifikácia pulcherimínu pomocou Ramanovej spektroskopie.

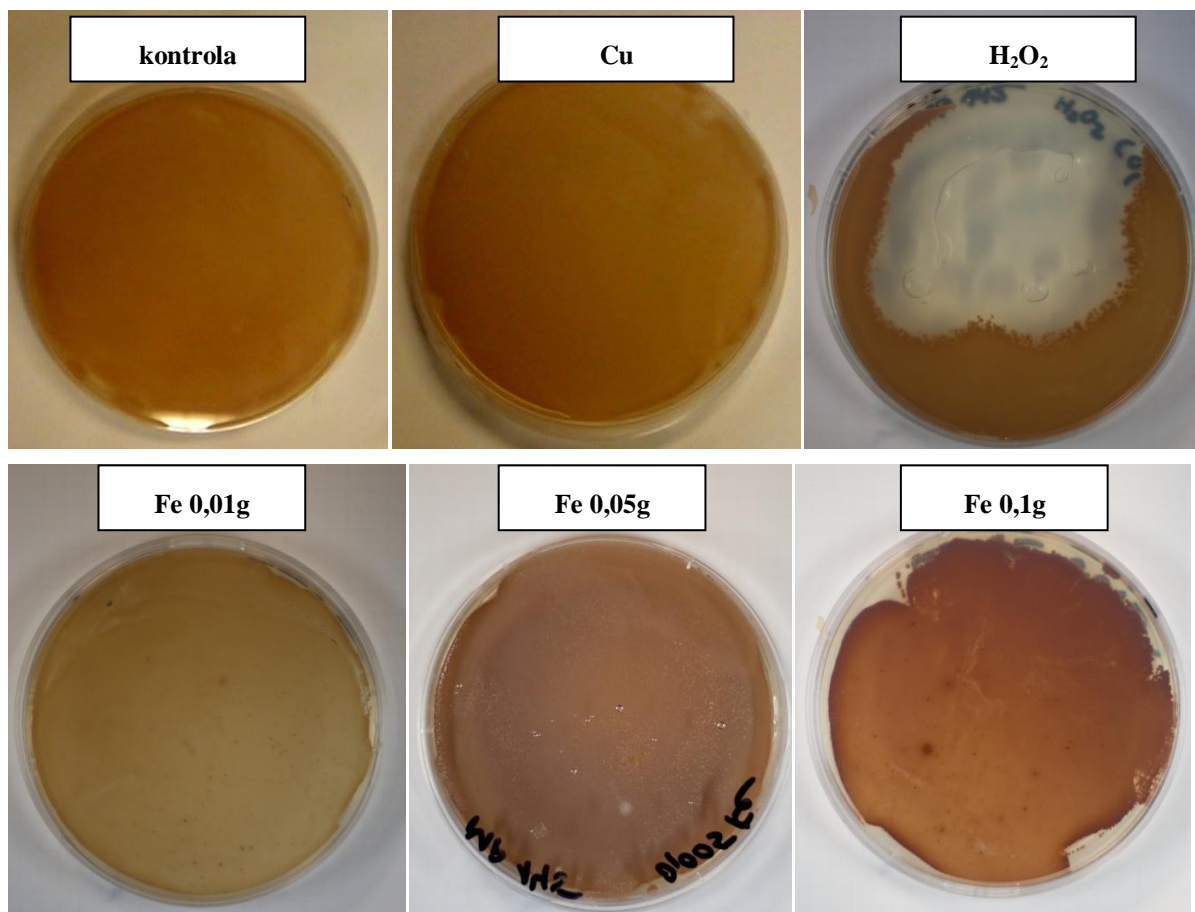
### 5.2.1 Vizuálne charakteristiky produkcie pulcherimínu

Na základe zmien v sfarbení kultivačných médií v porovnaní s kontrolným médiom je možné sledovať produkciu pulcherimínu a odhadnúť jej nárast či úbytok.

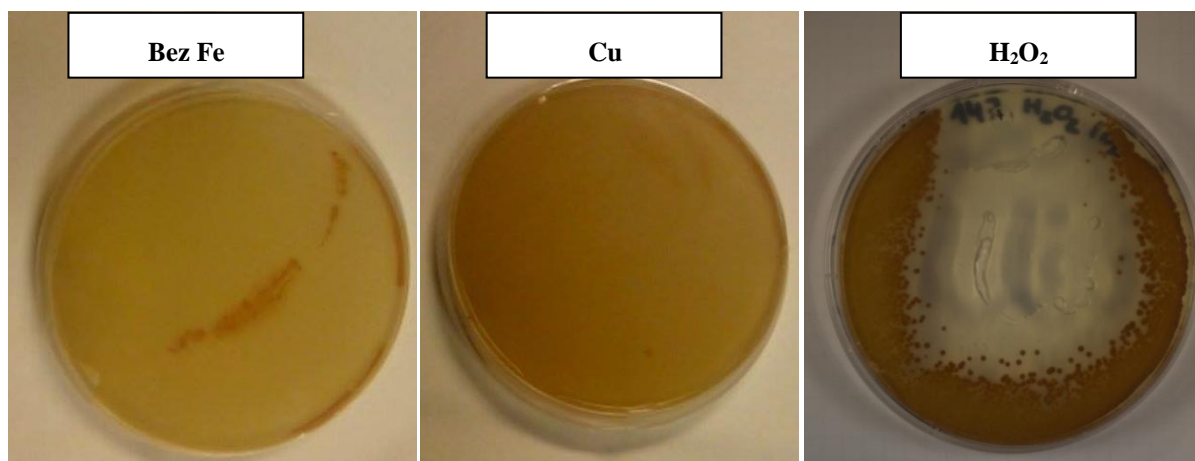
Zafarbenie jednotlivých médií (viz. obrázok 33-Obrázok 36) v závislosti na zložení bolo u všetkých kmeňov analogické. U všetkých štyroch kmeňov bolo kontrolné médium bledožlté, čo naznačuje, že v týchto médiách nedošlo k produkcii pulcherimínu, ktorý je typický svojou hnedou farbou. Médiá obsahujúce mednaté ióny boli tmavšej žltej farby oproti kontrole, z čoho možno usúdiť, že pravdepodobne došlo k vzniku pigmentu, vyznačujúcemu sa chelatickými vlastnosťami, avšak nie k vzniku pulcherimínu. Na prvý pohľad vidieť negatívny až letálny vplyv peroxidu vodíka na kvasinky rodu *Metschnikowia*. Koncentrácia peroxidu vodíka bola pravdepodobne príliš vysoká a preto nedošlo k rastu kultúry na miestach, kde sa nachádzal. V miestach, kde kvasinky neprišli do priameho styku s peroxidom vodíka, došlo k produkcii pulcherimínu, avšak treba poznamenať, že tieto média obsahovali 0,02 g/l železitých iónov, čo pravdepodobne súviselo so syntézou pigmentu.

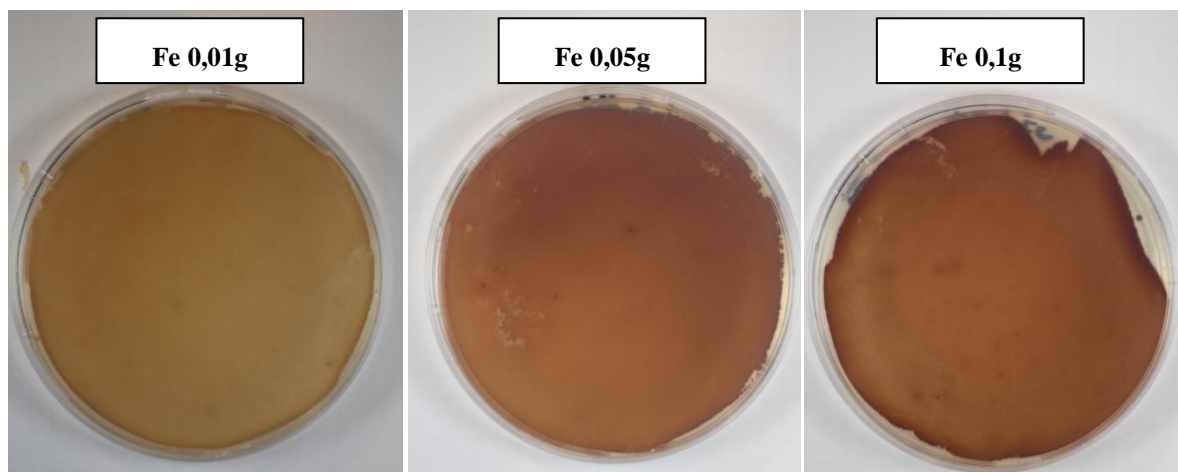
Po pridaní železitých iónov do média je možno pozorovať produkcia pulcherimínu od bledohnedej až po červenohnedú. Intenzita sfarbenia vzrástala so zvyšujúcou sa koncentráciou železa. Zo sýtosti farieb médií sa dá očakávať najvyššia produkcia pulcherimínu v médiách obsahujúcich 0,1 g/l železa.



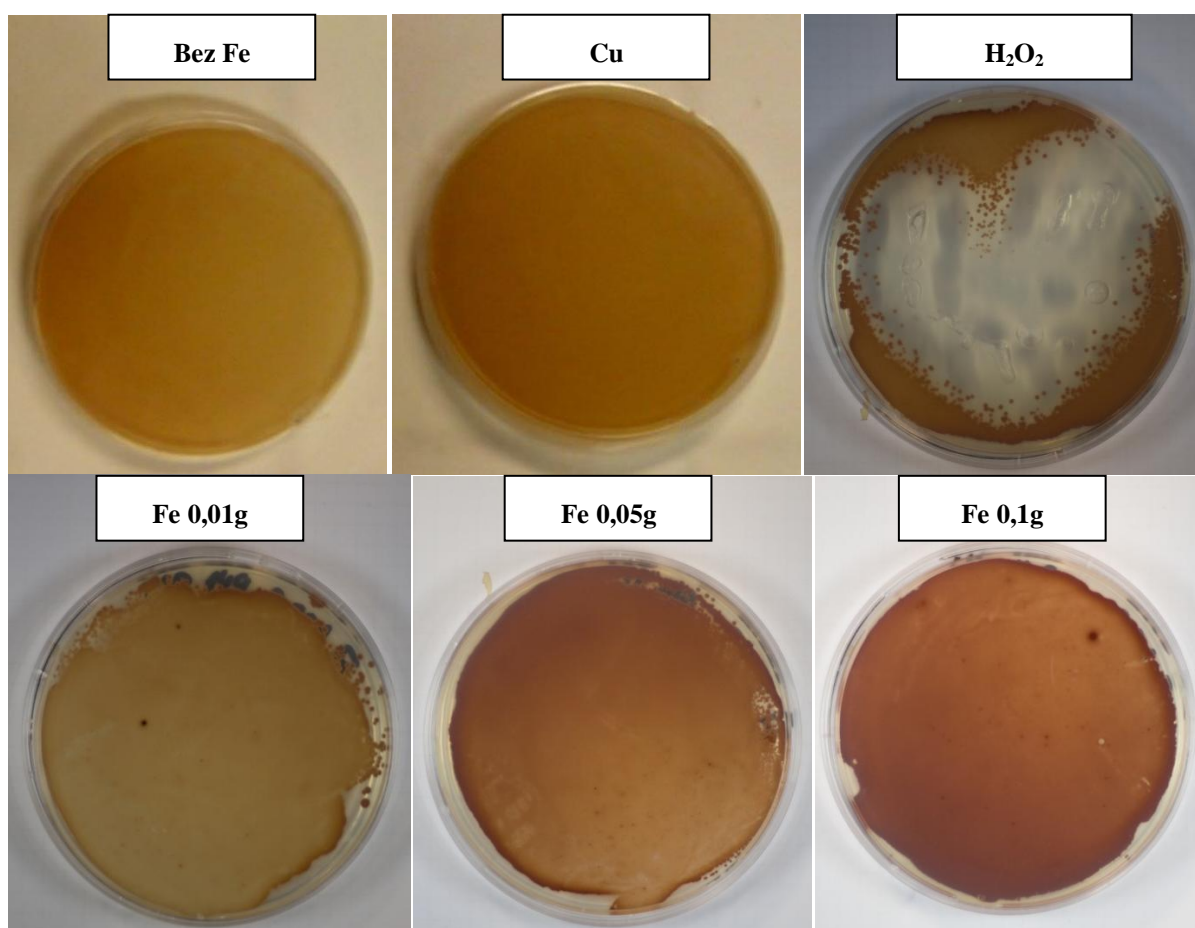


Obrázok 33: Zmeny v sfarbení médií u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 145

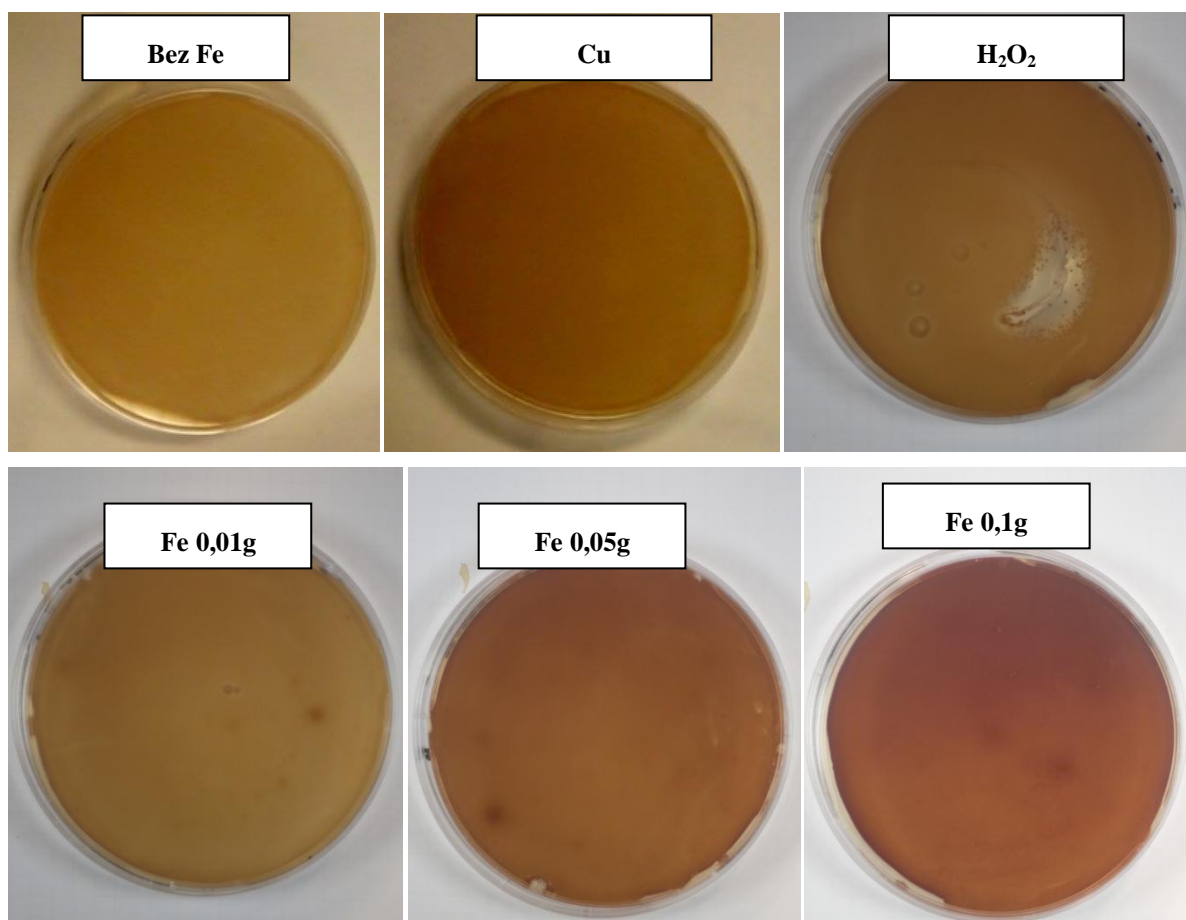




Obrázok 34: Zmeny v sfarbení médií u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 147



Obrázok 35: Zmeny v sfarbení médií u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 149

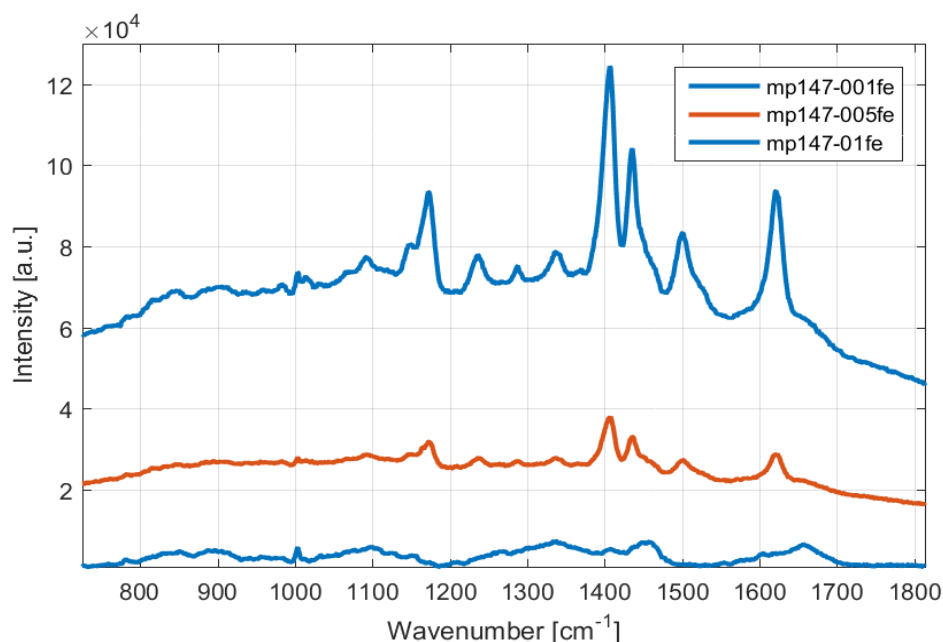


Obrázok 36: Zmeny v sfarbení médií u kvasinky *Metschnikowia andauensis* 129

### 5.2.2 Detekcia pulcherimínu pomocou Ramanovej spektroskopie

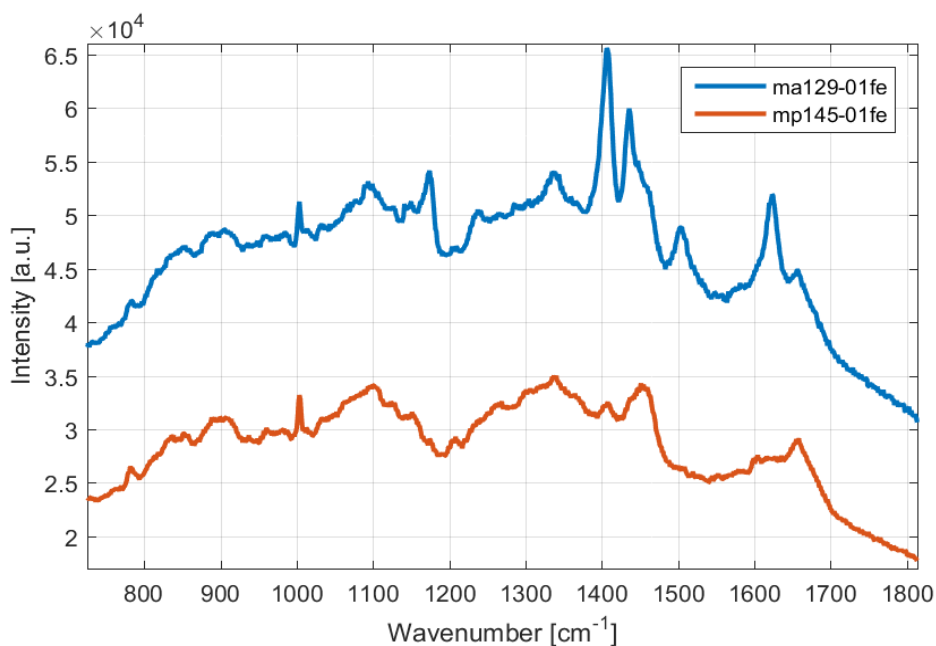
Na záver experimentálnej práce bola overená prítomnosť pulcherimínu vybranými kmeňmi pomocou Ramanovej spektroskopie na Ústave prístrojovej techniky Akadémie vied Českej republiky. Boli vybrané niektoré z vyššie uvedených médií a prítomnosť pulcherimínu bola detekovaná na základe pomeru intenzity špecifických pík, ktoré sa pre pulcherimín nachádzajú na  $1400\text{ cm}^{-1}$ .





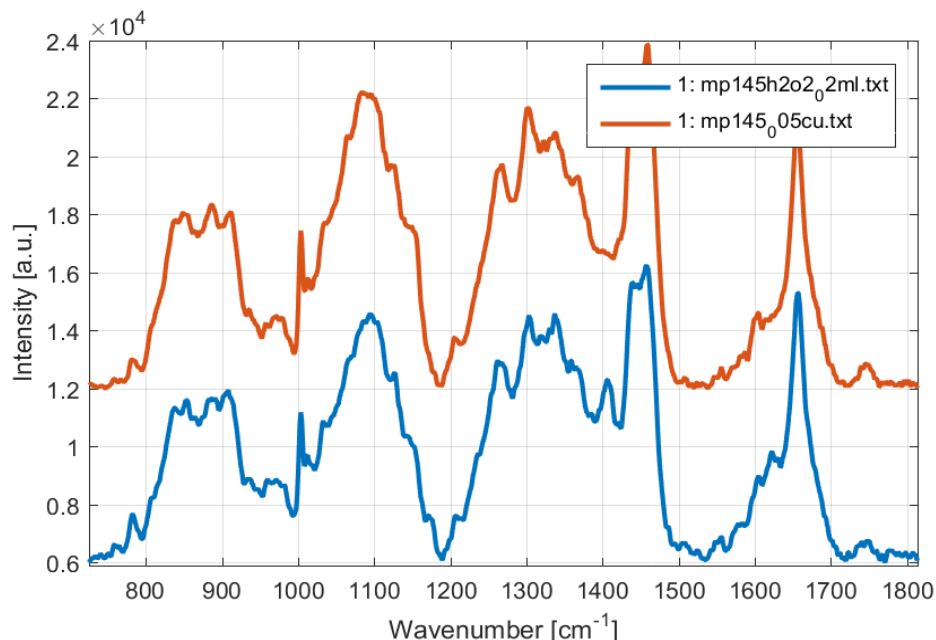
Obrázok 37: Ramanovské spektrá pulcherimínu produkovaného kvasinkou MP 147 na troch médiách o rôznej koncentrácii železa

Už na prvý pohľad je možno vidieť na Obrázku 37 zobrazujúcom Ramanové spektrá pulcherimínu vyprodukovaného kvasinkou *Metschnikowia pulcherrima* 147 na médiách s rôznou koncentráciou železa, silnú závislosť produkcie pulcherimínu na koncentrácii železitých iónov. Ako sa aj na základe vizuálneho pozorovania zmien v zafarbení týchto médií (viz. Obrázok 34) dalo odhadnúť, detekciou pomocou Ramanovej spektroskopie sa potvrdilo, že najvyššia produkcia pulcherimínu bola dosiahnutá v médiu obsahujúcom 0,1g/l železa.



Obrázok 38: Ramanovské spektrá pulcherimínu produkovaného na médiách s 0,1 g/l Fe kvasinkami MP 147 a MA 129

Na ďalšom obrázku (Obrázok 38) zobrazujúcom Ramanovské spektrá možno porovnať produkciu pulcherimínu produkovaného rozličnými kvasinkami – *Metschnikowia pulcherrima* 147 a *Metschnikowia andauensis* na rovnakých médiách obsahujúcich 0,01 g/l Fe. Viditeľne vyššiu koncentráciu pulcherimínu (pík na  $1400\text{ cm}^{-1}$ ) vidieť u kvasinky *Metschnikowia andauensis*.



Obrázok 39: Ramanovské spektrá pulcherimínu produkovaného kvasinkou MP 145 na médiu s obsahom Cu a na médiu s obsahom  $\text{H}_2\text{O}_2$

Ramanovské spektrá zobrazené na Obrázku 39 demonštrujú produkciu pulcherimínu kvasinkou *Metschnikowia pulcherrima* 145 na dvoch rozdielnych médiách – s obsahom medi a peroxidu vodíka. Ako sa dalo predpokladať aj na základe vizuálneho pozorovania, v prípade prídavku medi do média nie je na Ramanovom spektre pozorovaná produkcia pulcherimínu. Naopak, Ramanove spektrum média obsahujúceho peroxid vodíka vykazuje produkciu pulcherimínu, čo však pravdepodobne súvisí s prítomnosťou železitých iónov v tomto médiu.

### 5.3 Antagonistický efekt pulcherimínu

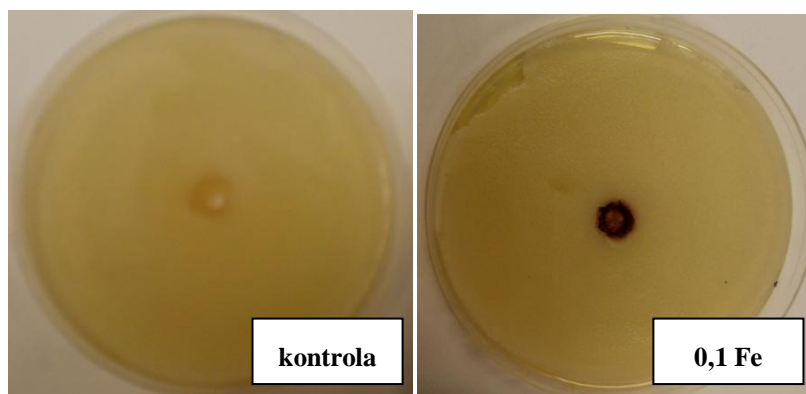
Na produkciu pulcherimínu, ktorého antagonistický efekt bol študovaný, boli použité opäť štyri kmene kvasiniek rodu *Metschnikowia*. Ako mikroorganizmy testované na inhibičný účinok pulcherimínu boli vybrané dve baktérie G- *Escherichia coli*, G+ *Lactobacillus sakei*, kvasinka *Candida glabrata* a pleseň *Phanerochaete chrysosporium*, u ktorých boli zaznamenané inhibičné zóny. Postup prevádzania antagonistického efektu je uvedený v kapitole 4.6.

### 5.3.1 Antagonistický efekt pulcherimínu na kvasinku *Candida glabrata*

Tabuľka 11: Antagonistický efekt pulcherimínu produkovaný jednotlivými kmeňmi rodu *Metschnikowia* na kvasinku *Candida glabrata*

Priemer inhibičných zón (mm)				
	<i>Candida glabrata</i>			
	Bez Fe	Cu	0,05 Fe	0,1 Fe
MP 145	0	0	4	1
MP 147	0	0	8	3
MP 149	0	0	2	1
MA 129	0	0	2	4

Pri testovaní antagonistického efektu pulcherimínu produkovaného jednotlivými kmeňmi kvasiniek rodu *Metschnikowia* na kvasinku *Candida glabrata* vykazoval antimikrobiálnu aktivitu iba v prípade prídavku železitých iónov do média. Najväčší inhibičný efekt bol dosiahnutý v médiách s prídavkom nižšej koncentrácie železa (0,05 g/l), v prípade MP 147 bolo pozorovaná inhibičná zóna až 8 mm. Jedinou výnimkou bol inhibičný efekt kvasinky MA, ktorý bol väčší pri vyššej koncentrácii železitých iónov. Čo sa týka intenzity sfarbenia pulcherimínu, tá bola väčšia v prípade vyššej koncentrácie železitých iónov.



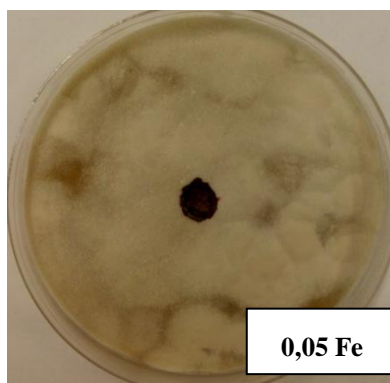
Obrázok 40: Inhibícia *Candidy glabrata* pulcherimínom produkovaným kvasinkou MP 147 v závislosti na použitom médiu

### 5.3.2 Antagonistický efekt pulcherimínu na plesň *Phanerochaete chrysosporium*

Tabuľka 12: Antagonistický efekt pulcherimínu produkovaný jednotlivými kmeňmi rodu *Metschnikowia* na plesň *Phanerochaete chrysosporium*

Priemer inhibičných zón (mm)				
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>			
	Bez Fe	Cu	0,05 Fe	0,1 Fe
MP 145	0	0	2	2
MP 147	0	0	2	2
MP 149	0	0	3	4
MA 129	0	0	2	2

Všetky kmene rodu *Metschnikowia* takisto vykazovali antagonistický efekt voči vláknitej plesni *Phanerochaete chrysosporium*. Z výsledkov je zrejmé, že táto antimikrobiálna aktivita pulcherimínu sa prejavila len v médiách obsahujúcich železité ióny. Veľkosť inhibičných zón bola zrovnateľná jednak v oboch prípadoch koncentrácie  $\text{Fe}^{3+}$  a jednak pri vzájomnom zrovnaní jednotlivých kmeňov kvasiniek produkujúcich pigment. Mierne vyšší inhibičný účinok na testovanú plesň mala kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 149.



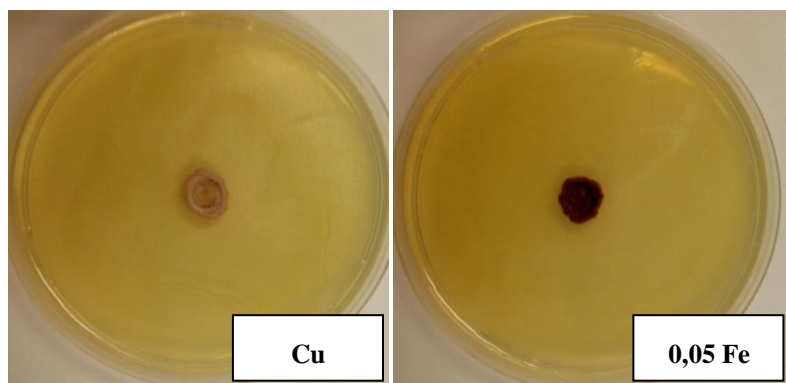
Obrázok 41: Inhibícia plesne *Phanerochaete chrysosporium* pulcherimínom produkovaným kvasinkou MP 145 v závislosti na použitom médiu

### 5.3.3 Antagonistický efekt pulcherimínu na baktériu *Lactobacillus sakei*

Tabuľka 13: Antagonistický efekt pulcherimínu produkovaný jednotlivými kmeňmi rodu *Metschnikowia* na baktériu *Lactobacillus sakei*

Priemer inhibičných zón (mm)				
	<i>Lactobacillus sakei</i>			
	Bez Fe	Cu	0,05 Fe	0,1 Fe
MP 145	1	2	2	3
MP 147	1	1	1	3
MP 149	1	1	1	2,5
MA 129	1,5	3	3	3

Na jednotlivých Petriho miskách s narastenou kultúrou baktérie *Lactobacillus sakei* bola na každom z použitých médií pozorovaná antimikrobiálna aktivita všetkých kvasinkových kmeňov. Inhibujúci pulcherimín na médiách bez obsahu železa sa prejavoval netypicky bledohnedým až krémovým sfarbením a inhibičné zóny na týchto médiách boli menšie poprípade zrovnateľné s inhibičnými zónami zaznamenanými na médiách obohatených o železité ióny. Schopnosť inhibície pulcherimínu aj v médiách bez prídavku železa bola pravdepodobne spôsobená prítomnosťou železitých iónov v autolýzátach (hovädzí, kvasničný) tvoriacich živné médiá vo vyšších množstvách než u ostatných testovaných mikroorganizmov. Najväčšie inhibičné zóny boli pozorované u všetkých kmeňov na médiu s 0,1 g/l Fe.



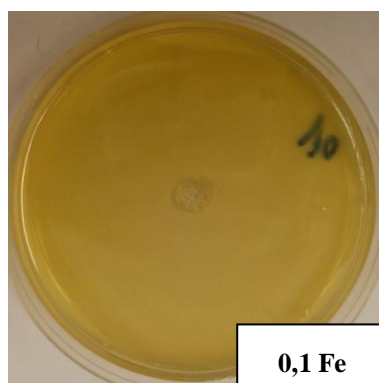
Obrázok 42: Inhibícia baktérie *Lactobacillus sakei* pulcherimínom produkovaným kvasinkou MP 149 v závislosti na použitom médiu

### 5.3.4 Antagonistický efekt pulcherimínu na baktériu *Escherichia coli*

Tabuľka 14: Antagonistický efekt pulcherimínu produkovaný jednotlivými kmeňmi rodu *Metschnikowia* na baktériu *Escherichia coli*

Priemer inhibičných zón (mm)				
	<i>Escherichia coli</i>			
	Bez Fe	Cu	0,05 Fe	0,1 Fe
MP 145	0	0	0	0
MP 147	0	0	0	0
MP 149	0	0	0	0
MA 129	0	0	0	0

Z výsledkov je zrejmé, že pri sledovaní antagonistického efektu pulcherimínu na baktériu *Escherichia coli* nebola zaznamenaná antimikrobiálna aktivita žiadneho z použitých kmeňov kvasiniek r. *Metschnikowia*. Neschopnosť pulcherimínu inhibovať rast baktérie *Escherichia coli* bol pravdepodobný úzko spätý so stavbou bunkovej steny odlišnou od bunkovej steny baktérie *Lactobacillus sakei*, u ktorej bol zaznamenaný antagonistický efekt pulcherimínu.



Obrázok 43: Inhibícia baktérie *Escherichia coli* pulcherimínom produkovaným kvasinkou MA

## 6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca sa zaoberá optimalizáciou produkcie biomasy, karotenoidov a sprievodných lipidických látok u karotenogénnych kvasiniek prostredníctvom kultivácie v podmienkach nutričného a oxidačného stresu. V rámci tejto štúdie bolo použitých šesť kmeňov karotenogénnych kvasiniek, a to dva kmene druhu *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces metaroseus* a *Sporobolomyces pararoseus*, ktoré boli navzájom porovnávané. Všetky tieto kmene boli kultivované na šiestich rôznych médiách navzájom sa líšiacich substrátom použitým ako hlavný zdroj uhlíka (glukóza, vaječné cestoviny) a koncentráciou peroxidu vodíka použitým ako stresový faktor. Získaná biomasa bola analyzovaná turbidimetricky a k stanoveniu karotenoidov a lipidických látok bola využitá metóda HPLC. Výťažky biomasy a sledovaných metabolitov u všetkých kvasiniek na jednotlivých médiách a kmeňov boli porovnané.

Vplyv cestovín ako nutričného zdroja na jednotlivé kmene sa líšil druhovo. Kvasinky rodu *Rhodotorula* vykazovali prevažne znížené produkcie biomasy a sledovaných metabolitov v porovnaní s glukózovými médiami. Výnimku tvoril len ergosterol, na produkciu ktorého bol pozorovaný priaznivý vplyv použitého odpadného substrátu. Nadprodukcie ergosterolu naznačujú zmeny v metabolizme syntézy sterolových látok a následne ich zvýšenú akumuláciu v membránach kvasiniek ako ochrana proti nutričnému stresu. Naopak, cestoviny pôsobili stimulačne na produkciu sledovaných metabolitov a biomasy u rodu *Sporobolomyces*, pravdepodobne vďaka vysokému obsahu dusíka prítomného vo vajíčku v cestovinách.

Medzi všetkými porovnávanými karotenogénnymi kvasinkami bol najvyšší nárast biomasy zaznamenaný u kvasinky *Sporobolomyces pararoseus* (15,5 g/l) na glukózovom médiu s 2 mM peroxidom vodíka, avšak na úkor produkcie karotenoidov i sledovaných lipidických látok. O niečo nižšia hodnota biomasy (11,66 g/l) bola pozorovaná takisto na glukózovom médiu s 2 mM peroxidom vodíka u kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*.

Výrazná nadprodukcia  $\beta$ -karoténu (1923,78  $\mu\text{g/g}$ ), celkových karotenoidov (3160,75  $\mu\text{g/g}$ ) a tiež aj ergosterolu (2078,94  $\mu\text{g/g}$ ) bola dosiahnutá u kvasinky *Sporobolomyces roseus* pri kultivácii na cestovinovom médiu v kombinácii s 2 mM peroxidom vodíka, kde sa výrazne ukázal pozitívny vplyv nutričného a oxidačného stresu, avšak na úkor biomasy, ktorá bola u tohto kmeňa najnižšia zo všetkých študovaných. Významná hodnota  $\beta$ -karoténu (780,24  $\mu\text{g/g}$ ) bola vyprodukovaná kvasinkou *Rhodotorula glutinis* 20-2-26 vplyvom 5mM koncentrácie peroxidu vodíka v glukózovom médiu, pričom bola súčasne zaznamenaná aj relatívne vysoká produkcia biomasy (9,85 g/l). Jednoznačne najvyššiu produkciu koenzýmu Q možno pripísať kvasinke *Sporobolomyces metaroseus* pri kultivácii na cestovinovom médiu s 5 mM peroxidom vodíka, ktorý pôsobil na kvasinku ako oxidačný stres. Tá pravdepodobne v snahe ochrániť biomembrány tvorila koenzým Q, ktorý je ich súčasťou.

Z výsledku kultivácie karotenogénnych kvasiniek je zrejmé, že všetky študované kmene sú schopné utilizovať cestoviny ako zdroj uhlíka a energie pre rast a produkciu karotenoidov i iných látok. Najmä v prípade kultivácie rodu *Sporobolomyces*, kde bol preukázaný významne stimulačný účinok tohto odpadného substrátu na produkciu, sa vaječné cestoviny javia ako vhodný substrát z priemyselného hľadiska najmä vďaka vysokému obsahu dusíka.

Na základe výsledkov sa tiež jednoznačne preukázalo využívanie exogénneho stresu v podobe peroxidu vodíka ako výhodný spôsob zvýšenia produkcie biomasy, karotenoidov a lipidických látok. V predloženej práci bolo teda potvrdené, že využitím cestovín, oxidačného stresu a ich vhodnou kombináciou možno dosiahnuť značné nadprodukcie biomasy, karotenoidov, ergosterolu i koenzýmu Q využiteľné napríklad vo farmaceutickom či krmivárskom priemysle.

Ďalšia časť tejto práce sa venuje možnostiam produkcie pulcherimínu pri použití rôzneho zloženia živných médií. Sledovaná bola najmä závislosť jeho syntézy s prítomnosťou železitých iónov v živnom médiu. Ako mikroorganizmy syntetizujúce pulcherimín boli použité štyri kmene kvasiniek: *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia pulcherrima* 149 a *Metschnikowia andauensis* 129. Tieto kmene boli následne kultivované na šiestich tuhých médiách s rôznym zložením. Mediá sa navzájom líšili rôznou koncentráciou iónov kovov, konkrétne železa a medi, a tiež bol aplikovaný oxidačný stres v podobe peroxidu vodíka. Následne boli pozorované vizuálne zmeny v zafarbení a niektoré z kultúr boli analyzované pomocou Ramanovej spektroskopie.

Na základe výsledkov bolo preukázané, že všetky kmene rodu *Metschnikowia* boli schopné produkcie pulcherimínu, avšak len na živných médiách obohatených o železité ióny. Vplyv peroxidu vodíka mal na kvasinky inhibičný efekt. So zvyšovaním koncentrácie železa bola pozorovaná jednoznačne zvýšená intenzita sfarbenia, čo nasvedčovalo aj zvýšenej produkcii pigmentu. Tento predpoklad bol potvrdený aj pomocou Ramanovej spektroskopie, kde bola zaznamenaná najvyššia produkcia pulcherimínu v médiu obsahujúcom 0,1 g/l železitých iónov, konkrétne u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 147.

Ďalší z experimentov spočíval v štúdiu antagonistického efektu pulcherimínu na vybrané mikroorganizmy, ktorými boli gramnegatívna baktéria *Escherichia coli*, grampozitívna baktéria *Lactobacillus sakei*, kvasinka *Candida glabrata* a vlákniť plesň *Phanerochaete chrysosporium*. Antimikrobiálne testy boli uskutočňované pomocou diskovej platňovej metódy na agarovej pôde s narastenou kultúrou jednotlivých testovaných mikroorganizmov, pričom boli použité rôzne médiá odlišujúce sa koncentráciou a druhom použitého iónu kovu (železo, meď). Po prejave antagonistického efektu boli zaznamenané inhibičné zóny.

U všetkých študovaných kmeňov rodu *Metschnikowia* bola preukázaná antimikrobiálna aktivita, ale líšila sa u každého kmeňa nezávisle na podmienkach. Jedinou výnimkou, voči ktorej nemalo pôsobenie pigmentu vplyv, bola G- baktéria *Escherichia coli*, čo možno pripísať odlišnej stavbe jej bunkovej steny. U kvasinky *Candida glabrata* bol zaznamenaná najväčšia inhibičná zóna (8mm) kvasinkou *Metschnikowia pulcherrima* 147 na médiu s 0,05 g/l železa. U plesne *Phanerochaete chrysosporium* bola veľkosť antagonistického efektu kvasinkami rodu *Metschnikowia* porovnateľná. U oboch týchto testovaných organizmov sa prejavila antimikrobiálna aktivita iba na médiách obohatených o železité ióny, na rozdiel od inhibície baktérie *Lactobacillus sakei*, ktorá sa prejavila na všetkých médiách. Inhibičné zóny na médiách bez prídavku železa však boli veľmi bledé, čo naznačuje prítomnosť nízkej koncentrácie  $\text{Fe}^{3+}$ , ktorá bola pravdepodobne spôsobená použitím autolyzátov (hovädzí, kvasničný) tvoriacich tieto živné médiá. Antimikrobiálna aktivita bola voči baktérii *Lactobacillus sakei* u všetkých kmeňov najvyššia (2,5 – 3 mm) v médiu s 0,1 g/l  $\text{Fe}^{3+}$ .

Na základe výsledkov sú zrejmé rozdiely vo veľkosti antimikrobiálnej aktivity voči jednotlivým testovaným mikroorganizmom v závislosti na kmeni rodu *Metschnikowia*, pričom každý z nich vykazoval iné produkčné vlastnosti. Na záver možno zhrnúť, že študované kvasinky rodu *Metschnikowia* inhibujú rast tak kvasiniek (*Candida glabrata*), vláknitých húb (*Phanerochaete chrysosporium*), ako aj niektorých baktérií (G+ *Lactobacillus sakei*) tým, že produkujú pigment pulcherimín, ktorý vyčerpáva železo v prostredí. Táto vlastnosť pulcherimínu sa javí ako veľmi významná z hľadiska biologickej kontroly, pretože poskytuje nové možnosti riešenia redukcie rôznych patogénnych mikroorganizmov. Z výsledkov teda môžeme potvrdiť, že kvasinka ma silný, prevažne antifugálny efekt voči množstvu humánnych patogénov.



## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957. Edícia literatúry pre potravinársky priemysel.
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). ISBN 80-05-00644-6.
- [5] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014, **13**(1), 12-. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859.
- [6] NAMITHA, K. K. a P. S. NEGI. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010, **50**(8), 728-760. DOI: 10.1080/10408398.2010.499811. ISSN 1040-8398.
- [7] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology*. 2009, **36**(2), 163-180. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. ISSN 1367-5435.
- [8] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [9] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [10] BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004-1-1, **63**(4), 351-361. DOI: 10.1007/s00253-003-1441-1. ISSN 0175-7598.
- [11] KLUYVER, A.J., J.P. VAN DER WALT a A.J. VAN TRIET. Pulcherrimin, The Pigment of *Candida Pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington: National Academy of Sciences, 1953, **39**(7), 583-593.
- [12] MACDONALD, J.C. Biosynthesis of pulcherriminic acid. *Biochemical Journal*. 1965, **96**(2), 533-538.
- [13] COOK, A. H. a C. A. SLATER. METABOLISM OF "WILD" YEASTS I. THE CHEMICAL NATURE OF PULCHERRIMIN. *Journal of the Institute of Brewing*. 1954, **60**(3), 213-217.
- [14] COOK, A. H. a C. A. SLATER. 797. Pulcherrimin: a synthesis of 1 : 4-dihydroxy-2 : 5-dioxopiperazines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1956, , 4130-4133. DOI: 10.1039/jr9560004130. ISSN 0368-1769.
- [15] COOK, A. H. a C. A. SLATER. 798. The structure of pulcherrimin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1956, , 4133-4135. DOI: 10.1039/jr9560004133. ISSN 0368-1769.

- [16] KUPFER, Dorothy G., Robert L. UFFEN a E. CANALE-PAROLA. The role of iron and molecular oxygen in pulcherrimin synthesis by bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*. 1967, **56**(1), 9-21.
- [17] BONNEFOND, L., T. ARAI, Y. SAKAGUCHI, T. SUZUKI, R. ISHITANI a O. NUREKI. Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, **108**(10), 3912-3917.
- [18] SIPIČZKI, M. Metschnikowia Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(10), 6716-6724.
- [19] TÜRKEK, Sezai a Beyza ENER. Isolation and Characterization of New Metschnikowia pulcherrima Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2009-01-1, **64**(5-6), 405-410.
- [20] CHANDI, Gurpreet Kaur a Balmeet Singh GILL. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. *International Journal of Food Properties*. 2011, **14**(3), 503-513.
- [21] HEZINOVÁ, V. *Využití moderních separačních a analytických technik k charakterizaci vybraných metabolitů karotenogenných kvasinek*. Brno, 2007. Diplomová práce. FCH VUT.
- [22] OLIVER, Jordi a Andreu PALOU. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881**(1-2), 543-555.
- [23] VAN DER WALT, Johannes Petrus. *On the yeast Candida pulcherrima and its pigment*. Druk: Excensiors Foto-Offset, 1952.
- [24] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Atlas kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava, 1990.
- [25] LI-CHAN, E.C.Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science*. 1996, **7**(11), 361-370.
- [26] MÁROVÁ, I., M. ČARNECKÁ, A. HALIENOVÁ, R. KOČÍ a E. BREIEROVÁ. Production of Carotenoid-/Ergosterol-Supplemented Biomass by Red Yeast Rhodotorula glutinis Grown Under External Stress. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, **48**(1), 56–61.
- [27] MÁROVÁ, I., E. BREIEROVÁ, R. KOČÍ, Z. FRIEDL, B. SLOVÁK a J. POKORNÁ. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Annals of Microbiology*. 2004, **54**(1), 73-85.
- [28] CASANOVA, J.M. Bacteria and their dyes: Hans Christian Joachim Gram. *Historia de la inmunologia*. 1992, **11**(4), 140-150.

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

UV	Ultra-violet = ultrafialové svetlo
HPLC	Vysokúčinná kvapalinová chromatografia
G+	grampozitívny
G-	gramnegatívny
MP 145	Metschnikowia pulcherrima 145
MP 147	Metschnikowia pulcherrima 147
MP 149	Metschnikowia pulcherrima 149
MA 129	Metschnikowia andauensis 129